

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

***Untersuchungen zu Biokompatibilität, Resorptionsverhalten und Knochenheilung
nach Implantation poröser Knochenersatzmaterialien
auf Basis von β -Tricalciumphosphat und DCP***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Henriette Lapczyna

Tierärztin
aus Magdeburg, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. sc. techn. Marc Böhner, PhD, Korreferent

Zürich 2012

Meinen Eltern
Elmar und Dorit Lapczyna

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Ziel der Arbeit	3
1.2 Versuchsanordnung	3
2 Literaturübersicht	5
2.1 Überblick über den Aufbau der mineralischen Komponente des Knochens	5
2.2 Knochenersatzmaterialien auf Basis von Calciumorthophosphaten	5
2.2.1 Einführung	5
2.2.2 Eigenschaften	7
2.2.3 Anwendung	7
2.3 Charakterisierung einzelner Calciumorthophosphatverbindungen	8
2.3.1 Hydroxylapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)	8
2.3.2 β -Tricalciumphosphat (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	8
2.3.3 Dicalciumphosphat (DCP, Monetit, CaHPO_4)	9
2.4 Abbaumechanismen von Calciumphosphatkeramiken in vivo	9
2.5 Einflussfaktoren auf Implantatresorption und Osseoregeneration	10
2.5.1 Innere Architektur von Knochenersatzmaterialien	10
2.5.2 Weitere Abhängigkeitsfaktoren von Implantatresorption und Osseoregeneration	13
2.5.3 Optimierung der Architektur von Knochenersatzmaterialien	14
3 Materialien und Methoden	16
3.1 Biomaterialien	16
3.2 Präoperatives Management und Anästhesie	19
3.2.1 Tiere	19
3.2.2 Operationsvorbereitung	19
3.2.3 Anästhesie	19
3.2.4 Antibiose und Analgesie	20
3.3 Chirurgie	20
3.3.1 Lagerung und Operationsvorbereitung	20
3.3.2 Instrumente	21

3.3.3	Operationsverlauf und Zugänge.....	21
3.3.4	Probenhandhabung intra operationem	23
3.4	Postoperatives Management	24
3.4.1	Tiere	24
3.4.2	Fluorochrome Markierung.....	24
3.4.3	Gewinnung und Aufbereitung der Proben für Mikroradiografie, Histologie und Histomorphometrie	24
3.5	Auswertung der Proben.....	26
3.5.1	Histomorphometrie	26
3.5.2	Histologie.....	27
3.5.3	Fluoreszenzmikroskopie	28
3.5.4	Statistische Untersuchung der Ergebnisse	28
3.5.5	Diffraktometrie der DCP- Proben (M7)	28
<hr/>		
4	Resultate.....	29
4.1	Operation.....	29
4.2	Postoperative Phase	29
4.3	Probengewinnung und -aufbereitung.....	29
4.4	Makroskopische Untersuchung und Radiografie.....	30
4.5	Histologie.....	30
4.5.1	Qualitative Untersuchung	30
4.5.2	Semiquantitative Untersuchungen	34
4.5.3	Untersuchung zu Zellgehalt und -verteilung.....	38
4.6	Histomorphometrie	42
4.6.1	Neugebildeter Knochen	43
4.6.2	Implantat	44
4.6.3	Weichteilgewebe.....	45
4.7	Röntgendiffraktometrie der DCP Proben	47
<hr/>		
5	Diskussion.....	48
5.1	Tiermodell und Versuchsaufbau	48
5.2	Biomaterialien und Implantatvorbereitung	49
5.3	Operation und Postoperative Phase	49
5.4	Probenverarbeitung und Auswertung	50
5.5	Ergebnisse	51

5.5.1	Qualität der Knochenneubildung.....	51
5.5.2	Implantatresorption und Knochenbildungsraten	52
5.5.3	Zellgehalt und -verteilung	54
5.5.4	Zusammenhang zwischen Materialeigenschaften und in vivo Verhalten der untersuchten Biokeramiken.....	55
5.6	Schlussfolgerungen	58
<hr/>		
6	Literaturverzeichnis.....	60
<hr/>		
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	66
7.1	Tabellen	66
7.1.1	Materialcharakterisierung und Probenverteilung	66
7.1.2	Resultate	66
7.2	Abbildungen	67
<hr/>		
8	Anhang	69
8.1	Tabellarische Übersichten der Ergebnisse	69
8.1.1	Semiquantitative Untersuchung	69
8.1.2	Untersuchungen zu Zellgehalt und -verteilung	73
8.1.3	Histomorphometrie.....	76
8.2	Abbildungen	79
8.3	Ergänzende Berichte.....	86
8.3.1	Production and characterization of the samples to be implanted	86
8.3.2	Phase Composition of DCPA Explantates	94
<hr/>		
9	Abkürzungsverzeichnis	96

Zusammenfassung

In dieser Studie wurden acht verschiedene Knochenersatzmaterialien aus β -Tricalciumphosphat und Monetit in einem Bohrlochmodell in die langen Röhrenknochen von Schafen implantiert. Für die Implantation lagen die Materialien als zylinderförmige poröse Blöcke oder als Granulat vor. Zusätzlich unterschieden sich die einzelnen Implantate bezüglich ihrer Mikroporosität, Korngröße und chemischen Zusammensetzung. Nach Ablauf der Beobachtungszeiträume von zwei, vier und acht Wochen wurden die Implantate, in dem sie umgebenden Knochengewebe, zurückgewonnen und auf ihre Biokompatibilität, Resorbierbarkeit und die induzierte Rate der Knochenneubildung untersucht. Die Auswertung erfolgte histologisch sowie histomorphometrisch. Alle Implantate waren biokompatibel, resorbierbar und führten zu guten Knochenneubildungsraten. Die β -TCP Implantate waren nach acht Wochen nahezu vollständig resorbiert und die Defekte waren teilweise bereits mit neuem Knochengewebe ausgefüllt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Mikroporosität tendenziell die Implantatresorption beschleunigt und, dass auch die Korngröße die Resorptionsrate von Calciumorthophosphatkeramiken in vivo beeinflusst. Löslichkeitsunterschiede zwischen verschiedenen Werkstoffen konnten durch Variation der Makroporosität ausgeglichen werden.

Summary

Eight types of bone graft substitutes composed of β -Tricalciumphosphate and Monetite were implanted into drill hole defects in cancellous bone of sheep either as porous blocks or as β -TCP granules. The implants differed mainly in their form of application, microporosity, grain size and chemical composition. Biocompatibility, resorbability and bone formation of the samples were assessed after two, four and eight weeks. Histology and histomorphometry were chosen for sample analysis. All of the eight bioceramics were biocompatible, resorbable and generally induced adequate bone formation in the defects. After an eight week period, resorption of the implants was nearly complete and, depending on the implanted material, the drillholes were filled with new bone structures to different extends. Differences in resorption rates between particularly fast resorbable ceramics were bufferd in vivo and were therefore less evident then expected. An increase in microporosity accelerated implant resorption by trend, whereas the impact of grain size on the resorption rate was hardly detectable. Differences in the solubility behaviour between the raw materials were compensated by a variation of macroporosity.

1 Einleitung

Die Beschleunigung der Knochenheilung ist ein wichtiger Schwerpunkt der orthopädisch- chirurgischen Forschung. Überschreitet ein Knochendefekt, beispielsweise in Folge eines Traumas oder eines chirurgischen Eingriffs, eine kritische Größe, so ist es zur Unterstützung der Heilung notwendig, das fehlende Material zu ersetzen. Als Alternative zu den für den Knochenersatz bevorzugten autologen Knochentransplantaten haben sich Biokeramiken auf Basis von Calciumorthophosphaten etabliert. Die Implantation von Knochenersatzmaterialien in einen bestehenden Defekt führt zu einer beschleunigten Regeneration des umliegenden Knochengewebes, indem es als Grundlage für die Anlagerung neuer Knochenstrukturen dient. Nach der Implantation solcher Biomaterialien ist die Rate von Implantatresorption und Knochenneubildung beeinflussbar durch Modifikation der Materialeigenschaften wie der chemischen Zusammensetzung, dem Aufbau der kristallinen Struktur und der Architektur der implantierten Kalziumphosphatkeramiken.

1.1 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurden Biokeramiken auf Basis von β -Tricalciumphosphat und Dicalciumphosphat hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, Resorptionsfähigkeit und der durch sie induzierten Knochenneubildungsrate untersucht. Weiterhin sollte geklärt werden, ob und in wie fern Mikroporosität, Korngröße und Makroporosität die Resorptionsrate einer Biokeramik beeinflussen. Das Verhalten eines Dicalciumphosphat- Implantats sollte mit dem der aus β -Tricalciumphosphat hergestellten Implantate verglichen werden. Anhand der Ergebnisse dieser Studie sollte geklärt werden, ob mit der Erhöhung der Kontaktfläche zwischen Zellen und Implantatoberfläche die Resorptionsrate weiter erhöht werden kann oder ob eine biologische Grenze der Resorptionsrate besteht.

1.2 Versuchsanordnung

Für diese Studie wurden 18 Schafe in drei Versuchsgruppen à sechs Tiere eingeteilt. Je eine der Gruppen wurde über einen Zeitraum von zwei, vier und acht Wochen beobachtet. Entsprechend dem von Nuss et al. beschriebenen Drillholemodell wurden jedem Schaf in einer Operation acht standardisierte Knochendefekte in Humerus und Femur gesetzt^{1,2}. In diese Defekte wurden anschließend acht verschiedene

Biomaterialien aus β -TCP und Monetit implantiert. Nach Ablauf der Beobachtungszeiträume, erfolgte die Rückgewinnung der Implantate im umgebenden Knochen. Die Knochenblöcke wurden dann mit folgenden Methoden untersucht: Mikroradiografie der histologischen Schnitte, Histomorphometrie und Histologie. Für die Auswertung wurden die histomorphometrische und die histologische Untersuchung herangezogen. Der Studie lag die Hypothese zugrunde, dass die Mikro- und Makroporosität sowie die Korngröße die Resorptionsrate der Keramiken und die Knochenneubildung beeinflusst.

2 Literaturübersicht

2.1 Überblick über den Aufbau der mineralischen Komponente des Knochens

Der Knochenersatz durch synthetische Biomaterialien stellt nach wie vor eine Herausforderung dar³, denn diese Materialien sollten idealerweise die natürliche, chemisch und architektonisch sehr komplex aufgebaute⁴, Knochenstruktur imitieren⁵. Die chemische Grundlage der mineralischen Komponente der Knochens, carboniertes, calziumdefizientes Hydroxylapatit $((\text{Ca}, \text{Na}, \text{Mg})_{10}(\text{PO}_4, \text{HPO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2)$, bildet ein kristallines System in das zusätzlich vielfältige weitere ionische Substituenten integriert sind^{6,7}. Diese sehr kleinen Apatitkristalle (40x25x1.5-3nm) lagern sich in die organische Matrix des Knochens ein und erhöhen so dessen Widerstandsfähigkeit gegen mechanische Belastungen^{4,8}. Die innere Architektur des Knochens ist je nach lokaler Belastung unterschiedlich: Während die Spongiosa eine Porosität (siehe Abschnitt 2.5.1.1.) von 50-90% mit einer Porengröße von 200µm bis 1000µm aufweist, beträgt die Porosität des kortikalen Knochens 3-12% bei einer Porengröße von 1-100µm. Der überwiegende Teil der Poren in der Spongiosa ist untereinander verbunden^{8,9}. Auch der die Druckfestigkeit und die Steifheit des Knochens beeinflussende Mineralisationsgrad ist variabel. Er nimmt nicht nur mit dem Alter zu, sondern ist auch abhängig von der Lokalisation des Knochengewebes im Skelett¹⁰.

2.2 Knochenersatzmaterialien auf Basis von Calciumorthophosphaten

2.2.1 Einführung

Grundsätzlich ist die Regenerationsfähigkeit des Knochengewebes zwar sehr gut¹¹, nach Traumata oder Operationen mit Knochensubstanzverlusten wird trotzdem häufig die Rekonstruktion einer Defektlokalisation mit Knochenersatzmaterialien notwendig¹². Das Mittel der Wahl hierfür ist die Transplantation autologen Knochens^{4,13}. Solche Autografts sind synthetischen Knochenersatzmaterialien aufgrund ihrer osteoinduktiven Wirkung überlegen. Ihr Einsatz ist aber auch mit zahlreichen Nachteilen für den Patienten, wie der Notwendigkeit einer zweiten Operation und den dabei möglicherweise auftretenden Komplikationen, verbunden³. Eine retrospektive Studie zeigte, dass nach der Gewinnung von autologen Knochentransplantaten in 8,6% der

Fälle Komplikationen durch den Eingriff an der Spenderstelle auftraten. Infektion, Hämatombildung, die Notwendigkeit einer Revision, persistierende Schmerzhaftigkeit nach sechs Monaten, Sensibilitätsverlust und Narbenbildung sind Probleme die nach der Gewinnung von Autografts auftreten können¹⁴. Aufgrund dieser hohen Komplikationsrate haben sich synthetische Knochenersatzmaterialien auf Basis von Calciumorthophosphaten als Alternative zu autologen Knochentransplantaten etabliert. Ihre Vorteile sind Sterilisierbarkeit, einfache Lagerung, die Möglichkeit sie mit den gewünschten strukturellen Merkmalen reproduzierbar zu synthetisieren, die erzielbare Werkstoffreinheit und ihr Potential als Matrix für die Applikation von Pharmaka zu dienen^{15,16}. Zahlreiche Calciumorthophosphatverbindungen wie Monocalciumphosphatmonohydrat (MCPM), Dicalciumphosphat (DCP), Dicalciumphosphatdihydrat (DCPD), Octacalciumphosphat (OCP), Hydroxylapatit (HA), α - und β -Tricalciumphosphat (α - und β -TCP), Biphasisches Calciumphosphat (Verbundstoff aus Hydroxylapatit und β -TCP (BCP)), Amorphes Calciumphosphat (ACP), Monocalciumphosphat (MCP) und Tetracalciumphosphat (TetCP) kommen bei der Herstellung von Knochenersatzmaterialien zum Einsatz^{4,17}. Je nach Indikation kann zwischen verschiedenen Applikationsformen der aus diesen Ausgangsstoffen hergestellten Knochenersatzmaterialien gewählt werden: Zemente, Blöcke, Granulate oder Kitte stehen zur Verfügung^{17,18}. Knochenzemente beispielsweise bieten eine gute mechanische Stabilität, sind aber kompakt strukturiert¹². Dadurch erfolgen Resorption und Knochenneubildung ausschließlich von der Defektperipherie ausgehend, was sich nachteilig auf den Heilungsprozess auswirken kann³. Biomaterialien in Form poröser Blöcke sind zwar mechanisch weniger stabil, das umliegende Knochengewebe kann sich aber besser mit ihnen verbinden und die Knochenneubildung kann multizentral erfolgen^{3,7,17}. Poröse Blöcke sind damit gut geeignet Defekte zu füllen, die kaum oder gar nicht mechanisch belastet werden. Auch Granulate bieten keine mechanische Stabilität, stimulieren das Knochenwachstum aber grundsätzlich gut. Die Migration der eingesetzten Partikel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, was zu Fülldefiziten und verringertem Knochenwachstum führen kann¹⁹. Am häufigsten kommen synthetische Knochenersatzmaterialien derzeit in Form poröser Blöcke oder Granulate zur Anwendung. Deren mechanische Schwäche wird dabei häufig durch die Kombination mit stabilisierenden Metallimplantaten ausgeglichen³. Zur Herstellung

solcher Implantate werden vor allem Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat und Biphasisches Calciumphosphat eingesetzt^{8,20}.

2.2.2 Eigenschaften

Calciumorthophosphate bieten dem Knochengewebe während des Heilungsprozesses strukturelle Unterstützung. Diese Eigenschaft wird als Osteokonduktivität bezeichnet. Außerdem sind Calciumphosphatverbindungen resorbierbar, biokompatibel und bioaktiv^{7,8}. Beim Einsatz von bioaktiven Materialien laufen chemische und biologische Reaktionen zwischen Material und Körperflüssigkeit ab, was dazu führt, dass sich eine direkte Verbindung an der Grenzfläche zwischen Implantat und Knochen ausbildet^{6,7,20,21}. Damit ist Bioaktivität die Grundlage der Osteokonduktivität. Zusätzlich konnte für einzelne synthetische Calciumphosphatkeramiken, abhängig von ihrem strukturellen Aufbau, eine osteoinduktive Wirkung nachgewiesen werden^{22,23}. Diese Biomaterialien hatten die Eigenschaft Osteogenese nicht nur im Knochen, sondern auch im Weichteilgewebe auszulösen⁷. Die Azidität und die Löslichkeit von Calciumphosphaten sind abhängig von der chemischen Konfiguration des Stoffs und sinken mit der Zunahme des Verhältnisses von Calcium zu Phosphor im Biomaterial. Azidität und Löslichkeit und demnach die Zusammensetzung eines synthetischen Knochenersatzmaterials beeinflussen das Resorptionsverhalten von Implantaten in vivo^{6,24}. Die Resorptionszeit eines Materials sollte idealerweise der Zeit entsprechen, die für den Ersatz des Materials durch neuen Knochen benötigt wird²⁵. Denn Reste eines schlecht resorbierbaren Implantats im Knochen verändern dessen biomechanische Eigenschaften, können die Ursache verminderter Biege-Resistenz sein und damit zur Schwachstelle eines Knochens werden²⁶. Aufgrund der chemischen Labilität der Oberflächen sehr gut löslicher und hochreaktiver Calciumorthophosphate, können diese in vivo zu weniger löslichen Verbindungen umgewandelt werden¹⁷. Ionenaustauschprozesse an der Grenzfläche zwischen Implantat und Gewebe sind die Ursache für solche möglichen Veränderungen der Materialkomposition schnell löslicher Calciumphosphatkeramiken im Organismus²⁷.

2.2.3 Anwendung

Synthetische Knochenersatzmaterialien finden in der rekonstruktiven Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie und bei Dentalanwendungen (Alveolarkammaugmentation, Sofortimplantation von Dentalimplantaten, Augmentation von Extraktionshöhlen)

Verwendung. Weiterhin werden sie genutzt zur chirurgischen Wirbelkörperfusion, zur Herstellung von Mittelohrimplantaten, zur Füllung von Knochendefekten nach orthopädischer oder Tumorchirurgie und zur Beschichtung von Metallimplantaten, welche in Dentalchirurgie und Orthopädie eingesetzt werden^{19,28,29}.

2.3 Charakterisierung einzelner Calziumorthophosphatverbindungen

2.3.1 Hydroxylapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

Aufgrund seiner Ähnlichkeit zur mineralischen Komponente des Knochens ist Hydroxylapatit das am meisten genutzte Calziumphosphat für die Herstellung chirurgischer Implantate sowie für die Beschichtung von Metallimplantaten^{6,8,30}. Im Organismus ist Hydroxylapatit jedoch nie in chemisch reiner Form vorhanden. Die Verbindung, mit einem Verhältnis von Calzium zu Phosphat von etwa 1,67, ist biokompatibel, osteokonduktiv und bioaktiv. Das Calzium- Phosphat- Verhältnis und damit die Eigenschaften der chemischen Verbindung in vivo variieren jedoch abhängig von der Herstellungsmethode: Sinterung bei über 800°C oder Präzipitation in wässriger Lösung¹⁷. Aufgrund der aus dem Verhältnis des Calziums zum Phosphat resultierenden geringen Löslichkeit der Verbindung im physiologischen Milieu verläuft der Abbau von Hydroxylapatit im Organismus langsam und noch Jahre nach der Implantation sind aus HA bestehende Implantate im Körper nachweisbar^{8,17,31}. Damit verläuft die Resorption eines Hydroxylapatit- Implantats im Verhältnis zur Regeneration des Knochengewebes sehr langsam und somit wird HA teilweise auch der Gruppe der nicht resorbierbaren Biomaterialien zugeordnet^{20,26}. Zukünftig könnte eine Annäherung an die strukturellen Eigenschaften natürlichen Knochens durch Synthese von nanokristallinem, carboniertem Hydroxylapatit die Resorbierbarkeit von Hydroxyapatitimplantaten erhöhen. Dies könnte dazu beitragen die Abbaugeschwindigkeit eines Implantats der Geschwindigkeit der Knochenbildung anzupassen^{6,13}.

2.3.2 β -Tricalciumphosphat (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

In der chemischen Verbindung Tricalciumphosphat, welche verschiedene kristallografische Strukturen annehmen kann, liegen Calzium und Phosphat in einem Verhältnis von 1,5 vor. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften ist derzeit nur β -TCP zur Herstellung von synthetischen Knochenersatzmaterialien in Form von porösen

Blöcken und Granulaten relevant¹⁷. Bereits im Jahr 1920 konnte nachgewiesen werden, dass, fünfprozentige Tricalciumphosphatlösung eine stimulierende Wirkung auf das Knochenwachstum hat. Die Lösung wurde damals in einem Kaninchenmodell zwischen die Frakturenden des Radius injiziert und beschleunigte die Frakturheilung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe³². β -Tricalciumphosphat ist biokompatibel, resorbierbar, osteokonduktiv und bioaktiv. Es wurde nachgewiesen, dass Knochengewebe eine direkte Verbindung mit β -TCP eingeht²¹ und, dass sich dabei eine stärkere Verbindung zwischen Knochen und Implantat ausbildet, als bei der Anwendung von Hydroxylapatitimplantaten³³. Der Abbau von β -Tricalciumphosphat erfolgt schnell und entspricht annähernd der Bildungsrate neuen Knochengewebes^{33,34}. Damit werden β -TCP- Implantate während des Heilungsprozesses resorbiert und können so möglichst vollständig durch Knochengewebe ersetzt werden^{20,28}. Die schnelle Resorptionsrate ermöglicht auch eine bessere Anpassung der Implantatstruktur an das neueinwachsende Gewebe und dessen einsprossende Blutgefäße³³. Auch die Osseoregeneration läuft bei Einsatz synthetischer Knochenersatzmaterialien auf Basis von β -TCP schneller ab als bei solchen aus Hydroxylapatit^{33,35}. Die Herstellung von Tricalciumphosphaten erfolgt durch Sinterung verschiedener Ausgangsverbindungen bei mindestens 650°C¹⁷.

2.3.3 Dicalciumphosphat (DCP, Monetit, CaHPO_4)

Diese Verbindung ist biokompatibel und schneller resorbierbar als β -TCP. Das Löslichkeitsprodukt von DCP entspricht dem des Serums^{17,36}. Die Verbindung konnte im Frakturkallus nachgewiesen werden und ist Bestandteil von Calciumphosphatzementen^{17,37}. Die Synthese von DCP Implantaten kann durch Sinterung aus β -TCP erfolgen³⁶.

2.4 Abbaumechanismen von Calciumphosphatkeramiken in vivo

Es wird zwischen zwei Abbaumechanismen unterschieden: der chemischen Lösung in der physiologischen Körperflüssigkeit und dem zellulären Abbau^{15,38}. Idealerweise entspricht die Resorptionszeit eines Implantats der Zeit, die benötigt wird um den Defekt zu überbrücken. In diesem Fall wäre das Implantat nach seinem Abbau vollständig durch neues Knochengewebe ersetzt. Löst sich ein Implantat, steigt die Konzentration der Calciumionen in der extrazellulären Flüssigkeit, was die Osteoblastenaktivität fördert. Bei Einsatz von unter physiologischen Bedingungen

schnell löslichen Biomaterialien erhöht sich somit die Knochenbildungsrate^{3,4,39,40}. Förderlich für die Regeneration des Knochengewebes ist dabei auch, dass die Abbauprodukte von Calciumorthophosphaten gleichzeitig die für die Mineralisation des neugebildeten Osteoids nötigen Ausgangsstoffe darstellen³. Der zelluläre Abbau erfolgt vorrangig durch Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, die am implantierten Material und in dessen Umgebung nachgewiesen werden können. Durch Exozytose des lysosomalen Inhalts dieser Zellen entsteht ein saures Mikroklima am Implantat, was zur Lösung der Calciumphosphatstruktur beiträgt^{41,42}. Die Verbindungen zwischen den einzelnen Körnern des Materials sind die Schwachpunkte der Implantatstruktur und werden zuerst aufgelöst, was zur Freisetzung von Partikeln ins Gewebe führt. Diese Partikel könnten einen Anreiz für die Zellmigration bieten und so die Ursache dafür sein, dass in der Umgebung von β -Tricalciumphosphat- Implantaten im Vergleich zu HA-Implantaten eine höhere Zelldichte nachgewiesen werden kann³⁴. Der zelluläre Abbau schnell resorbierbarer Stoffe wie DCPD und β -TCP erfolgt in erster Linie durch Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen^{2,43-45}. Sind Biomaterialien kleinmolekular, dominieren Makrophagen den zellulären Abbauprozess. Riesenzenen entstehen durch Fusion der Makrophagen, wenn diese nicht in der Lage sind das eingebrachte Fremdmaterial abzubauen⁴⁶ und tragen damit zum Abbau langsam resorbierbarer, großmolekularer Calciumorthophosphate bei^{44,45}.

2.5 Einflussfaktoren auf Implantatresorption und Osseoregeneration

2.5.1 Innere Architektur von Knochenersatzmaterialien

Resorptionsverhalten und Knochenregeneration in Knochenersatzmaterialien in vivo sind nicht nur abhängig von der chemischen Materialzusammensetzung, sondern auch von der inneren Struktur des betreffenden Implantats. Diese mikroarchitektonischen Parameter sind die Porosität des Implantats, die Struktur der Makroporen, die Poreninterkonnektivität und die Ausprägung der Mikrostruktur. Eine poröse, vernetzte Implantatstruktur fördert die Anlagerung von Osteoblasten und ermöglicht die Versorgung der eingewanderten Zellen durch Nährlösung in vitro und durch Vaskularisation des Gewebes in vivo.

2.5.1.1 Porosität

Der Begriff „Porosität“ beschreibt den prozentualen Anteil des Hohlraumvolumens an einem Festkörper, wobei nicht nur die Porengröße, sondern auch ihre Dichte entscheidend ist^{9,47}. Allgemein gilt: Die Steigerung der Porosität eines Implantats fördert dessen Osseointegration durch Förderung der Regeneration des Knochengewebes und Ermöglichung der Vaskularisation des Implantats. Poren erlauben es den Osteoblasten in das Implantat zu migrieren, sich dort anzusiedeln und dort zu proliferieren^{9,30}. Eine poröse Oberfläche fördert auch die Ausbildung einer mechanisch festeren Verbindung zwischen dem Implantat und dessen umliegendem Knochengewebe⁹. Die mechanische Stabilität einer Calciumphosphatkeramik nimmt allerdings mit zunehmender Porosität ab^{9,28,48} und auch eine schnelle Resorption kann zu einem mechanischen und strukturellen Defizit führen, noch bevor sich neuer Knochen bilden kann. Die ideale Porosität eines Biomaterials ergibt sich demnach als Kompromiss zwischen größtmöglicher Porosität für eine gute Osseointegration und einer ausreichenden mechanischen Stabilität des Materials⁹.

2.5.1.2 Makroporosität

Mit dem Ziel die Osteokonduktivität synthetischer Knochenersatzmaterialien zu optimieren, wurden viele Studien angefertigt. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag darin zu bestimmen, welchen Einfluss Makroporenstruktur und -größe auf die Knochenheilung haben⁴⁸⁻⁵⁸. Hulbert et al. ermittelten bereits 1970 eine minimal notwendige Porengröße für die Regeneration des Knochengewebes von 75-100µm⁵⁹. Heute geht man davon aus, dass Implantate eine Porengröße von mindestens 100µm haben sollten um die Blutversorgung im einwachsenden Gewebe sicher zu stellen²⁸. Die Suche nach der optimalen Makroporenstruktur gestaltet sich allerdings schwieriger als die Suche nach deren Minimalgröße. In einer Literaturübersicht wurden die Resultate vieler zu diesem Thema angefertigten Studien zusammengefasst. Es ergab sich, dass eine Makroporengröße von über 300µm ideal für die Unterstützung der Osteogenese ist⁹. Andere Autoren fanden Optima zwischen 100 und 400µm^{60,61}. Insgesamt sind die zu diesem Thema angefertigten Studien jedoch schwer miteinander vergleichbar, denn sie unterscheiden sich im Tiermodell, im verwendeten Material, der Charakterisierung der eingesetzten Biomaterialien und in den beobachteten Zeitintervallen⁹.

Die Anordnung der Makroporen kann bei der Herstellung eines Implantats nach einer „solid freeform fabrication“- Methode genau bestimmt werden. So konnte

beispielsweise festgestellt werden, dass eine regelmäßig zylindrisch angelegte Makroporenstruktur die Widerstandsfähigkeit von Implantaten aus Hydroxylapatit gegen Kompressionskräfte erhöht. Diese Anordnung der Poren führte andererseits nach Explantation zu schlechteren Ergebnissen bezüglich der Flexibilität des Knochens⁴⁸.

2.5.1.3 Interkonnektion der Poren

Sind die Poren eines Implantats untereinander verbunden, fördert dies die Zelleinwanderung und die Einsprossung von Blutgefäßen. Auf diese Weise wird das Knochenwachstum positiv beeinflusst^{47,48,51,62}. Die Vernachlässigung der Poreninterkonnektivität bei der Materialcharakterisierung könnte eine Erklärung dafür sein, dass unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen Versuchen zur Makroporosität erzielt wurden⁴⁷. Die Verbindung der Poren untereinander fördert die Osteokonduktion und ein Mindestdurchmesser dieser Verbindungen von 20µm ermöglicht den Osteoblasten in das Implantat einzuwandern. In den auf diese Weise besiedelten Poren synthetisieren Osteoblasten extrazelluläre Matrix als Grundlage für den darauf folgenden Ossifikationsprozess. Sind die interkonnektierten Poren mindestens 50µm weit, können auch Blutgefäße direkt in implantierte Biokeramiken einwachsen und diese schnellere Vaskularisation des Knochenersatzmaterials fördert die Knochenbildung. Dabei ist zu beachten, dass die Makroporen als Ort der Knochenapposition einen größeren Durchmesser haben müssen als die als Vaskularisationsgrundlage dienenden Interkonnektionen. Grundsätzlich gilt, dass die Dichte von Makroporen und Interkonnektionen zwischen den Makroporen in resorbierbaren Materialien wichtiger ist als nur ihre Größe, da die Größe durch den Resorptionsprozess beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu sind Größe und Dichte von Makroporen und Interkonnektionen in nicht, beziehungsweise langsam resorbierbaren Materialien gleich wichtig⁴⁷. Als Optimum für die Weite der Interkonnektionen konnte für poröse Hydroxylapatitimplantate ein Wert von 130µm ermittelt werden⁵⁴.

2.5.1.4 Mikrostruktur der Oberfläche

Poren mit einer Größe von 0,1 bis 10µm werden als Mikroporen bezeichnet. Ihr Vorhandensein beeinflusst Geschwindigkeit und Ausmaß der Knochenregeneration positiv⁶³⁻⁶⁵. In vivo konnte gezeigt werden, dass β -TCP Zylinder mit strukturierter Mikrooberfläche bei gleicher Porosität und Makroporengröße schneller resorbiert werden als solche mit einer glatten Mikrooberfläche. Ursache ist die Vergrößerung der

Kontaktfläche zwischen Implantat und extrazellulärer Flüssigkeit und damit der Angriffsfläche des Implantats für den chemischen und zellulären Abbau. Demnach muss neben der Makro- auch die Mikroporosität eines Implantats analysiert werden, um dessen Reaktivität im Organismus beurteilen zu können⁶⁶. Werden mikroporöse Biokeramiken an ektopischer Stelle implantiert, wirken sie im Gegensatz zu solchen ohne strukturierte Mikrooberfläche osteoinduktiv. Es konnte gezeigt werden, dass mikroporöse Hydroxylapatitimplantate die Knochenbildung in der dorsalen Rückenmuskulatur von Hund und Ziege induzieren^{22,23}.

Durch die Einlagerung von Osteoblasten in die Mikroporen entsteht eine dichte Verzahnung zwischen Knochen und Implantat. Der Begriff „multiscale osteointegration“ beschreibt diesen Vorgang des Einwachsens von Knochengewebe sowohl in Makro-, als auch in Mikroporen. Dies führt dazu, dass die Gesamtstruktur einem stark strukturierten, dreidimensionalen Gerüst im Sinne eines Verbundmaterials gleicht. Vermehrte Möglichkeiten zur Zellanlagerung fördern die Knochenbildung und verbessern die mechanischen Eigenschaften von Implantaten⁶³.

2.5.2 Weitere Abhängigkeitsfaktoren von Implantatresorption und Osseoregeneration

Neben der chemischen Zusammensetzung eines Biomaterials und der Architektur eines Implantats gibt es zahlreiche weitere Faktoren die Materialresorption und Knochenneubildung beeinflussen. Diese Einflussfaktoren sind: Spezies, individuelle Merkmale des Patienten wie Alter, Geschlecht und Stoffwechselaktivität, Tiermodell, lokale Entzündungsprozesse am Implantationsort, der Zeitpunkt der Untersuchung nach der Implantation, die mechanische Belastung des Implantats und außerdem die Größe des Implantats und vor allem der Implantationsort^{49,61}. Auch die Beschichtung von Knochenersatzmaterialien mit osteoinduktiven Stoffen wie Wachstumsfaktoren oder Zellen beeinflusst die Effektivität der Knochenneubildung⁹.

Die Zusammensetzung, die Architektur und das Heilungsverhalten des Knochens unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Spezies⁶⁷. Aus der Bedeutung der in einer Studie untersuchten Tierart und der gewählten Implantationslokalisation ergibt sich, dass auch die Wahl des Tiermodells die Ergebnisse eines Versuchs beeinflusst^{68,69}. Kommt es nach Implantation schnell resorbierbarer Materialien zu einer entzündlichen Reaktion, kann diese, bei unveränderter oder gesteigerter Resorptionsgeschwindigkeit, die Heilung verzögern. Bei einer Entzündung sinkt der pH-Wert im Gewebe, was die

Löslichkeit von Calciumphosphaten fördert^{34,70}. Die Resorptionsrate verändert sich außerdem im Lauf der Heilungsphase. Sie ist kurze Zeit nach der Implantation am höchsten und verlangsamt sich später^{71,72}. Bekannt ist weiterhin, dass die mechanische Stimulation des Knochens dessen Heilung fördert⁷³. Bezüglich des Implantationsortes konnte folgendes festgestellt werden: Nach der Implantation eines Biomaterials ist die Rate der Knochenbildung im kortikalen Knochen am höchsten, geringer in der Spongiosa und am kleinsten im medullären Knochen, die Resorptionsrate des Biomaterials verhält sich genau umgekehrt. Am ausgewogensten ist das Verhältnis zwischen Resorption und Knochenneubildungsrate damit im spongiösen Knochen. Zur Beurteilung der Biokompatibilität eines Materials wäre eine Untersuchung im medullären Knochen am aussagekräftigsten, da dieser am sensibelsten auf das Implantat reagiert³³.

2.5.3 Optimierung der Architektur von Knochenersatzmaterialien

Trotz vieler Studien konnte keine ideale Implantatstruktur postuliert werden, denn die optimale Architektur eines Knochenersatzmaterials ist auch von der geplanten klinischen Anwendung abhängig^{12,61,65}. Die ungenaue Charakterisierung der untersuchten Materialien und die Anwendung verschiedener Materialanalyseverfahren beeinträchtigen die Vergleichbarkeit der in Tierstudien gewonnenen Resultate^{9,65}. Daher wird für künftige Untersuchungen eine systematischere Herangehensweise empfohlen⁶⁵: Studien sollten mit der Motivation durchgeführt werden, die Einflussfaktoren auf Osseoregeneration und Implantatresorption sowie deren Interaktionen zu definieren. Es wäre sinnvoll vor der Durchführung von Tierstudien, entsprechend der zu untersuchenden Hypothese, theoretische Modelle zu entwerfen um die vermuteten Zusammenhänge systematisch analysieren zu können^{61,74,75}. Ein einheitliches Tiermodell, Synthese von Implantaten entsprechend der gegebenen Fragestellung, deren möglichst genaue Charakterisierung vor der Implantation⁷⁶ und die Verifizierung des erstellten theoretischen Modells nach Abschluss der Tierstudie, würden die Ergebnisse einer Tierstudie allgemeingültiger, aussagekräftiger und vergleichbarer machen. Der Erkenntnisgewinn einer Studie könnte so maximiert werden, denn Computersimulationen unter Verwendung verifizierter Modelle könnten dann künftig genutzt werden um geeignete Implantate für eine Indikation zu entwerfen⁶⁵.

In diesem Zusammenhang etablierten Böhner und Baumgart ein theoretisches Modell um die Effekte der Mikro- und Makroporengeometrie auf die

Resorptionsgeschwindigkeit von Knochenersatzmaterialien in Form von Zementen, Granulaten und porösen Blöcken voraussagen. Unter Einbeziehung verschiedener Faktoren wie Porosität, Größe der Mikro- und Makroporen, der Interkonnektionen und der Geometrie der Gesamtstruktur, konnte eine gute Korrelation des Modells mit experimentellen Ergebnissen verschiedener Studien nachgewiesen werden^{61,74}. Die in solchen Modellen entworfenen Materialien könnten mit gut kontrollierbaren Materialsynthesemethoden synthetisiert werden^{60,64,77-79}. Auch „Free Form Fabrication“-Methoden ermöglichen, dass Biokeramiken mit geometrisch definierter Architektur synthetisiert werden können⁷⁹⁻⁸². Die Kontrolle der Materialeigenschaften ist bei diesen Herstellungsverfahren allerdings auf die Makrostruktur eines Implantats beschränkt⁶⁵.

3 Materialien und Methoden

3.1 Biomaterialien

In dieser Studie wurden acht verschiedene Biomaterialien aus β -TCP und Monetit in Schafknochen implantiert (Tab. 1).

Tab.1: Übersicht über die implantierten Biomaterialien

Material	Bezeichnung	Applikationsform
M1	hohe Mikroporosität und kleine Korngröße	zylindrischer Block, 13x8mm
M2	hohe Mikroporosität und große Korngröße	zylindrischer Block, 13x8mm
M3	geringe Mikroporosität und kleine Korngröße	zylindrischer Block, 13x8mm
M4	geringe Mikroporosität und große Korngröße	zylindrischer Block, 13x8mm
M5	cyclOS	zylindrischer Block, 13x8mm
M6	turbOS	zylindrischer Block, 13x8mm
M7	DCP	zylindrischer Block, 13x8mm
M8	cyclOS (Granulat: 1.4-2.8mm)	Granulat: 1.4- 2.8mm

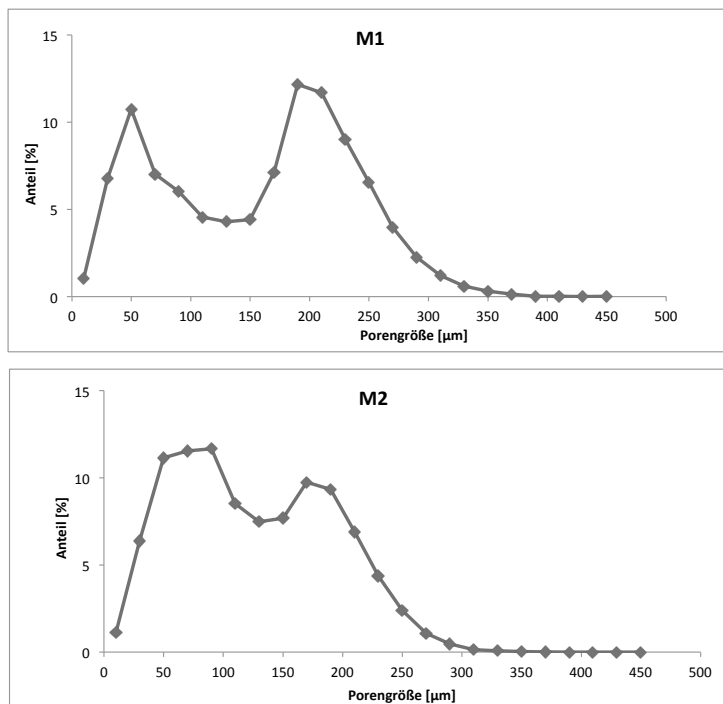
Die Probensynthese erfolgte durch die RMS Foundation (Skeletal Substitutes Group, 2544 Bettlach, Schweiz) nach der Calciumphosphatemulsionsmethode⁷⁷. Details zu Herstellung und Analyse der Implantate finden sich in Abschnitt 8.3.1 (Bericht, Laëtitia Galea: „Production and characterization of the samples to be implanted“). Durch Anfertigung von μ - Computertomografien der Proben prä implantationem, wurden deren strukturelle Eigenschaften weiter analysiert (Silke Wüst, ETH Zürich, Institut für Biomechanik, Wolfgang Pauli Straße 14, 8093 Zürich, Schweiz). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Materialanalysen, zeigen die Tabellen 2 u. 3, sowie die Abbildung 1. Zur Operation lagen die Proben trocken und in einem steril eingeschweißten Eppendorfreaktionsgefäß vor.

Tab. 2: Charakterisierung der Materialeigenschaften

	Zusammensetzung der kristallinen Phase	Korngröße (μm)	spez. Oberfläche (m^2/g)
M1	>99% β -TCP, <1% α -TCP	0,70 \pm 0,30	0,60 \pm 0,03
M2	>99% β -TC, Spuren: α -TCP	5,00 \pm 2,00	0,40 \pm 0,02
M3	>99% β -TCP, <1% α -TCP	0,80 \pm 0,20	0,80 \pm 0,08
M4	84% β -TCP, 16% α -TCP	5,00 \pm 1,00	0,60 \pm 0,02
M5	>99% β -TCP, <1% α -TCP	1,20 \pm 0,40	0,50 \pm 0,04
M6	>99% β -TCP, <1% α -TCP	0,29 \pm 0,05	2,00 \pm 0,01
M7	99%DCP, <1% α -TCP; Spuren: DCPD, β -TCP	9,00 \pm 2,00	6,00 \pm 0,60
M8	>99% β -TCP, <1% α -TCP	1,20 \pm 0,40	0,45 \pm 0,01

Tab.3: Charakterisierung der Materialeigenschaften

	Porosität (Vol.-%)	Makroporosität (Vol.-%)	Mikroporosität (Vol.-%)	Interkonnektivität (1/ mm^3)
M	8,80 \pm 0,5	59,8 \pm 2,4	24,0	879,6 \pm 28,6
M2	1,20 \pm 0,7	58,4 \pm 2,6	22,8	935,4 \pm 4,90
M3	78,3 \pm 4,0	59,3 \pm 1,5	19,0	405,9 \pm 94,3
M4	78,8 \pm 0,5	61,1 \pm 1,4	17,7	519,7 \pm 8,90
M5	75,2 \pm 0,5	55,1 \pm 1,6	20,1	419,1 \pm 86,5
M6	80,7 \pm 0,6	62,1 \pm 1,5	18,6	439,7 \pm 66,7
M7	60,6 \pm 0,7	38,0 \pm 1,3	22,6	132,8 \pm 24,4

**Abb.1.1.: Größe der Makroporen, Verteilungsdiagramme**

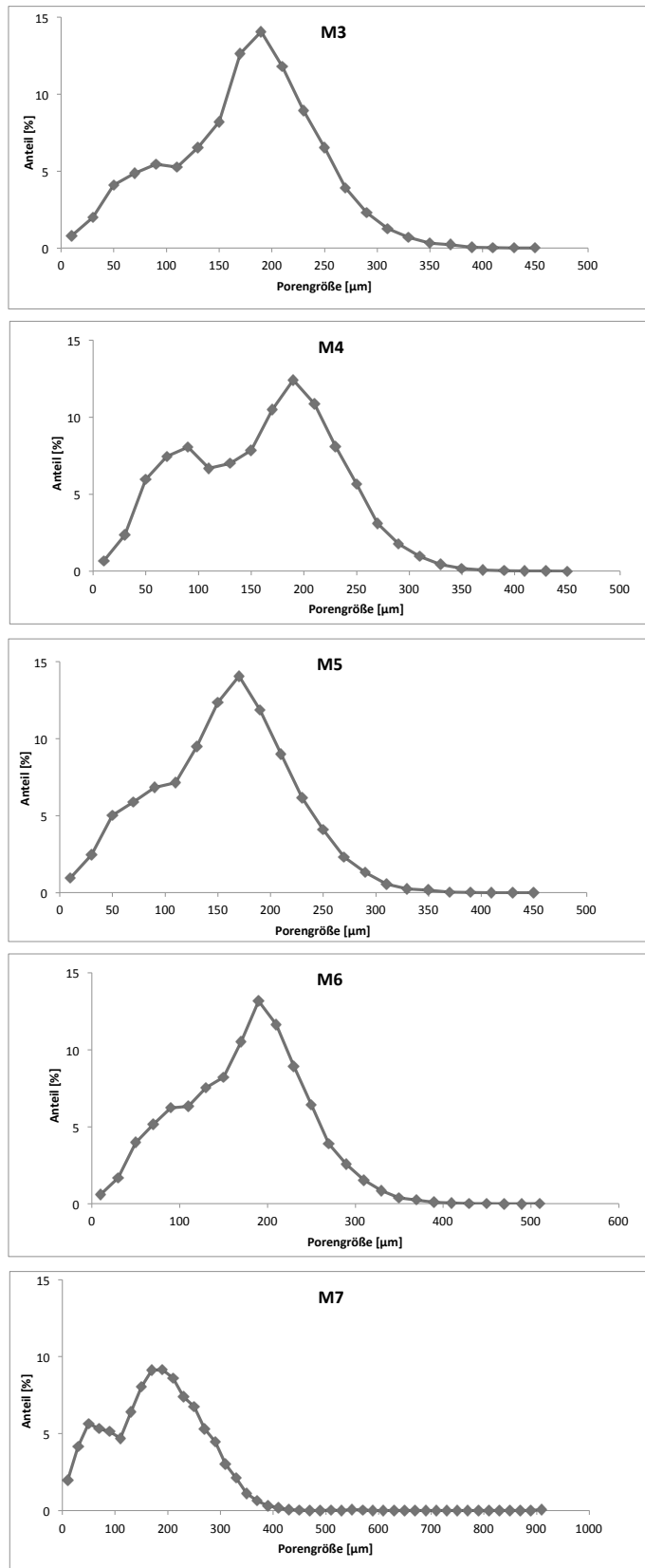


Abb.1.2.: Größe der Makroporen, Verteilungsdiagramme

3.2 Präoperatives Management und Anästhesie

3.2.1 Tiere

Als Versuchstiere dienten 18 dreijährige, weibliche Schweizer Alpenschafe. Ihr Gewicht betrug im Durchschnitt 77kg (63-88kg). Die Tiere stammten aus der institutseigenen Herde, deren regelmäßige Bestandsbetreuung und -pflege durch die Tierärzte der Forschungseinrichtung erfolgte. Die Tiere waren Maedi Visna negativ, wurden entsprechend der Befallssituation entwurmt, waren geimpft gegen Moderhinke (Footvax, Intervet, Vertrieb: Veterinaria AG, Pfäffikon, Schweiz) und gegen durch Clostridien und Pasteurellen verursachte Infektionen (Ovilis Heptavac P, Intervet, Vertrieb: Veterinaria AG, Pfäffikon, Schweiz). Die Klauenpflege aller Tiere erfolgte im Abstand von sechs Wochen. Die Studie wurde vom Kantonalen Veterinäramt Zürich am 19. Oktober 2010 mit der Bewilligungsnummer 199/2010 genehmigt.

3.2.2 Operationsvorbereitung

Bereits zwei Wochen vor der Operation wurden die betreffenden Schafe in Kleingruppen ins Tierspital transportiert um sich an ihre neue Umgebung gewöhnen zu können. Die Haltung der Schafe erfolgte in Herden von bis zu sechs Tieren. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere klinisch untersucht und es wurde von jedem Tier eine Blutprobe genommen. Angefertigt wurde neben einem Hämatogramm auch eine blutchemische Untersuchung folgender Werte: Gesamtbilirubin, Harnstoff, Aspartataminotransferase, γ -Glutamyltransferase, Creatinkinase, Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Magnesium und Phosphat. Zwei Tage prä operationem erfolgte die Schur der Wolle im späteren Operationsgebiet. Stets stand den Tieren Wasser zur Verfügung. Das Futter wurde ihnen 24 Stunden vor der Operation entzogen.

3.2.3 Anästhesie

Eine halbe Stunde vor Transport der Tiere in den Operationstrakt, erfolgte die Prämedikation im Stall mit Xylazin (0,1mg/kg KGW, i.m.) und Buprenorphin (0,01mg/kg KGW, i.m.). Nach Ankunft im Operationsbereich wurde ein Venenkatheter (BD Angiocath 14GA 3.25IN, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Inc., Sandy, USA) in die Vena jugularis externa gelegt und an der Haut fixiert (Supramid, 2-0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Jedes Tier erhielt zur Tetanusprophylaxe eine Dosis equines Tetanuserum (500IE, s.c.). Anschließend

erfolgte die Narkoseeinleitung unter Verwendung von Diazepam (0,1mg/kg KGW, i.v.), Ketamin (3-5mg/kg KGW, i.v.) und Propofol (0,2-0,4 mg/kg KGW, i.v.). Im Anschluss an Narkoseeinleitung und Intubation wurde eine balancierte Anästhesie durchgeführt. Unter Verabreichung von Isofluran (1,0- 1,5 Vol.-%) und Propofol (Infusionsrate: 0,1mg/kg/min) wurde die Narkose aufrechterhalten. Stets überwachte ein Veterinäranaesthesist die Narkose. Um die eindeutige Identifizierbarkeit der Tiere zu gewährleisten, wurde jedes Schaf während der Narkose entsprechend seiner Projekt Nummer mit einer Ohrmarke (Rinderohrmarke „Junior“, Allflex, Hamburg, Deutschland) gekennzeichnet und zusätzlich wurde jedem Tier ein Mikrochip (Petlink, Datamars SA, Bedano- Lugano, Schweiz) implantiert.

3.2.4 Antibiose und Analgesie

Über den intravenösen Zugang erfolgte präoperativ die Applikation von Benzylpenicillin (35000 IE/kg KGW), Gentamicinsulfat (4mg/kg KGW) sowie Carprofen (4mg/kg KGW). Alle Schafe wurden anschließend nach dem folgenden Verabreichungsschema für vier Tage antibiotisch und antiinflammatorisch behandelt: Penicillin G: BID, Gentamicin: SID, Carprofen: SID. Zur peri- und postoperativen Analgesie erhielten die Tiere zusätzlich ab der Narkoseeinleitung am Tag des Eingriffs insgesamt vier Injektionen Buprenorphin (0,001mg/kg KGW, i.m.) im vierstündigen Intervall.

3.3 Chirurgie

3.3.1 Lagerung und Operationsvorbereitung

Das Schaf wurde auf einer Vakuummatte zunächst in rechter Seitenlage gelagert. Nach Abschluss der Operation auf der linken Körperseite folgte die Umlagerung des Tieres für den chirurgischen Eingriff auf der rechten Körperseite. Das Tier war so gelagert, dass der Humerus parallel zum Operationstisch lag und die Gliedmaße im Ellenbogen gerade so stark angewinkelt war dass, sich der Epicondylus humeri lateralis unter der Haut deutlich darstellte. Das Bein musste in dieser Position so weit unterstützt werden, dass bei Druckausübung durch den Chirurgen keine Positionsveränderung erfolgen konnte. Für die starre Fixation der Gliedmaße wurde Gewebeklebeband genutzt (Abb. 5, Abschnitt 8.2). Das Hinterbein war so gelagert, dass der Femur cranial des Hinterbeines der Gegenseite und nach distal leicht abfallend zu liegen kam. Im

Gegensatz zur Vordergliedmaße erfolgte keine starre Fixation, sondern lediglich eine leichte Unterstützung des Kniegelenks, sowie eine leichte Unterlagerung des Tieres im proximalen Beckenbereich (Abb. 6, Abschnitt 8.2). Nach der Lagerung des Tieres wurde das Operationsfeld großzügig nachgeschoren und standardmäßig antiseptisch behandelt: Dreimalige Waschung mit Chlorhexidinseife und Desinfektion mit Alkohol (70%) im Wechsel. Abschließend wurde das Operationsfeld mit alkoholischem Chlorhexidinspray (Chlorhexidin 0,5% in Isopropanol 70% gefärbt, Kantonsapotheke Zürich, Schweiz) behandelt.

3.3.2 Instrumente

Neben dem Standardoperationsbesteck wurden folgende Instrumente benötigt: Wundspreizer nach Weitlaner und Gelpi, ein Raspatorium, eine pneumatische Bohrmaschine (Synthes, Waldenburg, Deutschland), ein stumpfer und ein spitzer Bohrer mit einem Durchmesser von 8mm und Tiefenbegrenzung (KaVo INTrASurg 500® Ka Vo Dental AG Biberach, Deutschland, modifiziert durch Synthes, Waldenburg, Schweiz), eine Bohrschutzhülse und ein Trokar zur Probeninsertion mit einem Innendurchmesser von 8mm (Abb. 7, Abschnitt 8.2).

3.3.3 Operationsverlauf und Zugänge

Alle Zugänge erfolgten von lateral¹. Die Hautschnitte waren durchschnittlich sechs bis acht Zentimeter lang. Der Eingriff erfolgte immer zunächst auf der linken und dann auf der rechten Körperseite des Tieres und die Zugänge wurden stets in folgender Reihenfolge angelegt: proximaler Humerus, distaler Humerus, proximaler Femur, distaler Femur. Auch die Proben wurden in dieser Reihenfolge implantiert. Um die Operationszeit zu verkürzen, arbeiteten zwei Chirurgen parallel an den Zugängen der Schulter- und der Beckengliedmaße. War die Implantationsstelle am Knochen freigelegt, wurde mit dem Raspatorium das Periost abpräpariert. Dies erleichterte die korrekte Durchführung der Bohrung, indem es ein Abrutschen des Bohrers erschwerte. Die Löcher wurden zunächst bis zu einer Tiefe von circa einem Zentimeter mit einem spitzen Bohrer vorgebohrt. Anschließend kam ein Bohrer mit stumpfer Spitze und Tiefenarretierung (13mm) zur Anwendung. Die Löcher wurden vor der Implantation der Probenzylinder mit 0,9%iger Natriumchloridlösung gespült, ausgesaugt und mit steriler Gaze gereinigt (Abb. 12 und 13, Abschnitt 8.2).

3.3.3.1 Zugang an der proximalen Humerusdiaphyse

Die Inzision der Haut erfolgte in nach caudal konvex gebogener Linie über das Schultergelenk hinweg vom Acromion ausgehend bis zum proximalen Teil der Humerusdiaphyse. Die Durchtrennung der subkutanen Faszien legte die Mm. omotransversarius, deltoideus pars acromialis und trapezius (von cranial nach caudal) frei. Die Muskeln wurden nach caudal retrahiert. Damit wurde die Ansatzsehne des M. infraspinatus sichtbar. Die Sehne bildet einen Winkel mit einem kleinen Gefäß, welches von caudal in Richtung der Sehne zieht. Sehne und Gefäß bilden einen Winkel. Hier wurde distal des Gefäßes und caudal der Sehne das Bohrloch angelegt.

3.3.3.2 Zugang zum Epicondylus lateralis humeri

Der Hautschnitt begann zwei Zentimeter über dem Epicondylus humeri und endete in Höhe des Radiuskopfes. Er verlief in nach caudal konvex gebogener Linie über das Ellenbogengelenk und über den Epicondylus humeri. Durch Inzision der Faszien über diesem Punkt wurde der Ursprung des lateralen Kollateralbandes am Bandhöcker dargestellt. Dessen Fasern wurden parallel zur Verlaufsrichtung durchtrennt. Dies ermöglichte die Bohrung des Lochs in der Mitte der Bandgrube des Condylus lateralis humeri.

3.3.3.3 Zugang zur proximalen Diaphyse des Femurs

Der Hautschnitt zog über das Hüftgelenk und den Trochanter major des Femurs bis zum proximalen Teil der Femurdiaphyse. Nach Präparation durch das subkutane Gewebe wurde der M. gluteus medius stumpf entlang seines Faserverlaufes durchtrennt. Nach Inzision der darunter liegenden Faszia lata konnte der M. vastus lateralis dargestellt werden. Ein Längsschnitt durch diesen, distal des Trochanters, erlaubte Zugang zum Knochen. Senkrecht zu dessen Längsachse wurde das Loch gebohrt.

3.3.3.4 Zugang zum Condylus femoris

Der Hautschnitt wurde caudal des Seitenbandes und cranial des lateralen Femurcondylus angelegt. Er begann auf Höhe des dorsalen Patellarrandes und endete im Bereich der proximalen Diaphyse der Tibia. Nach Präparation durch das subkutane Gewebe war die Aponeurose des M. biceps femoris sichtbar. Die Faszie des Biceps femoris wurde auf einer Länge von zwei Zentimetern eröffnet und die Muskelfasern in diesem Bereich stumpf durchtrennt bis zum lateralen Condylus des Femurs. Das

Bohrloch wurde distal des Ursprungs des lateralen Kollateralbandes des Kniegelenks angelegt.

3.3.3.5 Wundnaht

Zur Adaptation der Muskeln, zum Vernähen der Faszien und für die subkutane Naht kam ein polyfiler Polyglactin Faden (Vicryl, 2/0, Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien) zur Anwendung. Die Haut wurde mit Hautklammern (Auto Suture Appose ULC 35W, United States Surgical/ Tyco Healthcare Group LP, Norwalk, USA) adaptiert. Anschließend wurden die Inzisionen mit einem Wundverband aus steriler Gaze bedeckt und mit Hautklammern fixiert.

3.3.4 Probenhandhabung intra operationem

Zur Operation lagen die Proben steril und trocken in einem steril eingeschweißten Eppendorfreaktionsgefäß vor. Jede Probe war bereits vor der Operation einem Tier und einer Implantationsstelle zugeteilt (Tab. 3) und entsprechend gekennzeichnet worden (Abb. 8, Abschnitt 8.2)

Tab. 4: Angabe der Implantationsorte der Materialien M1 bis M8 (1-8) für die Tiere 1-18

Zeitgruppe	acht Wochen						vier Wochen						zwei Wochen					
Tiernummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Humerus proximal links	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8
Humerus distal links	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1
Femur proximal links	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2
Femur distal links	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3
Humerus proximal rechts	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4
Humerus distal rechts	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5
Femur proximal rechts	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6
Femur distal rechts	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7	6	5	4	3	2	1	8	7

Ersatzproben für jedes Material waren zusätzlich vorbereitet. Vor der Implantation wurden die Probenzylinder in einer Nierenschale mit steriler Natriumchloridlösung (NaCl 0,9% Fresenius, Fresenius Kabi AG, 61346 Bad Homburg, Deutschland) gewässert, bis sie vollständig getränkt waren. Das Granulat wurde nach Einfüllen in den Applikator durchtränkt (Abb. 10 u. 11, Abschnitt 8.2). Eine an der Oberfläche jedes Probenzylinders vorhandene Kerbe wurde bei der anschließenden Implantation in den Knochendefekt stets nach cranial ausgerichtet (Abb. 9, Abschnitt 8.2).

3.4 Postoperatives Management

3.4.1 Tiere

Die Schafe wurden in kleinen Gruppen von bis zu sechs Tieren gehalten und hatten stets Zugang zu Wasser und Heu. Die Tiere wurden täglich auf Lahmheit und Anzeichen klinischer Erkrankung hin untersucht. Die Klammern der Verbandgaze wurden nach drei Tagen entfernt und die Hautklammern nach zehn bis zwölf. Die zur Vier- und zur Achtwochengruppe gehörigen Schafe wurden nach zwei Wochen in den Stallungen des Tierspitals zum Staffeleghof transportiert, wo ihnen Weidegang ermöglicht wurde. Für die Schlachtung erfolgte der Rücktransport der Tiere der Vier- und der Achtwochengruppe zum Tierspital.

3.4.2 Fluorochrome Markierung

Alle Schafe erhielten Injektionen fluoreszierender Farbstoffe um eine spätere fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Proben zu ermöglichen. Die Substanzen wurden subkutan und verteilt auf bis zu vier Depots à 20ml, nach folgendem Schema appliziert:

- Allen Tieren wurde Calceingrün (5mg/kg KGW; Calceindinatriumsalz, Art. Nr. 21030, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Deutschland) am zwölften Tag nach der Operation injiziert. Die Lösung hatte einen pH-Wert von 7,3 und bei einer Impfkonzentration von 0,5% wurde 1ml/kg Körpergewicht verabreicht.
- Den Tieren der vier und der acht Wochen Gruppen wurde Xylenolorange (90 mg/kg KGW, Art Nr. 33825, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Deutschland) in 9,0%iger Lösung (pH-Wert= 7,3) injiziert. Von dieser Lösung erhielt jedes Schaf 24 Tage post operationem 1ml/kg Körpergewicht.
- Die Tiere der acht Wochen Gruppe erhielten zusätzlich eine Injektion Oxytetracyclin (20mg/kg KGW) am 54. Tag post operationem.

3.4.3 Gewinnung und Aufbereitung der Proben für Mikroradiografie, Histologie und Histomorphometrie

Nach der Schlachtung wurde das Weichteilgewebe von Humeri und Femora abpräpariert. Die Knochen wurden beschriftet und fotografiert (Nikon D5000, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland; Abb. 16, Abschnitt 8.2). Weiterhin wurden von den Knochen Röntgenaufnahmen in lateromedialer (90°) und anterior-posteriorer (0°)

Richtung angefertigt (49kV, 1s; Faxitron X-Ray System, Hewlett Packard, Mc Minnville Division, USA; Abb. 17, Abschnitt 8.2). Anschließend wurden die Implantate in Knochenquadern mit einer Größe von maximal 1,5x2x2,2cm mit einer Bandsäge (Kolbe Maschinenteknik GmbH, Elchingen, Deutschland) herausgesägt. Die angefertigten Radiografien dienten hierbei zur Lokalisation der Implantate im Knochen. Anschließend wurden die Proben in Glasgefäße verbracht und für mindestens sieben Tage fixiert (Alkohol, 40%). Nach der Fixation wurden die Proben in aufsteigender Alkoholreihe (40-100%) dehydriert. Die Aufbewahrung der Probengefäße erfolgte unter Lichtabschluss auf einem Laborschüttler (HS501 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland). Für die Anfertigung von Mikro-Computertomografien (μ -CT) wurden die Proben in 70%igen Alkohol gelagert (In dieser Arbeit erfolgte keine Auswertung der Resultate.). Auf die Dehydratationsreihe folgte die Entfettung der Proben in Xylol und anschließend die einwöchige Infiltration der Proben mit Methylmethacrylat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) im Vakuum. Schließlich konnten die Proben in luftdichte Teflonformen umgesetzt werden und die Polymerisation des PMMA wurde bei Raumtemperatur eingeleitet. Die ausgehärteten Probenblöcke wurden mit einer Innenlochsäge (Leica SP1600, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) gesägt. Dies erfolgte senkrecht zur Probenzylinderachse in zwei Ebenen (Abb.2):

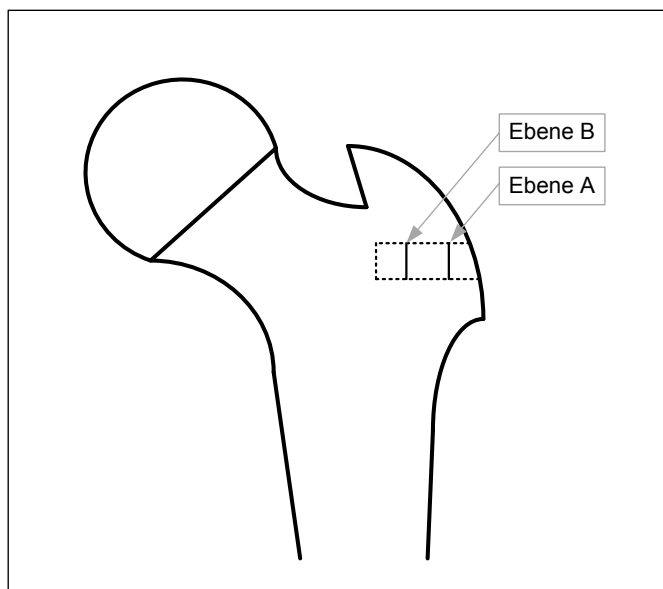


Abb.2:

Ebene A befindet sich im lateralen Drittel des Probenzylinders, Ebene B wurde im medialen Drittel des Zylinders geschnitten (beispielhafte Darstellung am proximalen Femur).

- Ebene A: Lateral im ersten Drittel des Zylinders wurden zwei Schnitte angefertigt (350 und 500µm).
- Ebene B: Im medialen Drittel des Probenzylinders wurden ebenfalls zwei Schnitte angefertigt (350 und 500µm). Zusätzlich wurden in dieser Ebene zwei Dünnschnitte (5µm) mit einem Schnittmikrotom (Leica RM2155, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die 350µm Schnitte nativ auf einen Objektträger aufgebracht (Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland; Cementit® CA 12, Merz + Benteli AG, Niederwangen, Schweiz). Von den 500µm dicken Schnitten wurden zunächst Mikroradiografien angefertigt (55kV, automatische Belichtungszeit; LX-60 Radiography System, Faxitron X-Ray, Lincolnshire, USA; Abb. 18-25, Abschnitt 8.2) und danach wurden sie für die histomorphometrische Untersuchung vorbereitet: zunächst Aufbringen auf Akropal Objektträger (PMMA opal 120002EP 75x45x3mm, Maagtechnik, Dübendorf), dann Schleifen auf eine Dicke von 70µm (Planopol- V, StruersA/S, Rodovre, Dänemark) und schließlich Oberflächenfärbung mit Toluidinblau. Die Dünnschnitte wurden auf einen chromgelatinebeschichteten Objektträger aufgezogen, mit einer Kisolfolie bedeckt, im Wärmeschrank über zwei Tage getrocknet (42°C) und nach van Kossa/ McNeal und in Toluidinblau gefärbt.

3.5 Auswertung der Proben

3.5.1 Histomorphometrie

Die mit Toluidinblau gefärbten Dickschnitte wurden bei 5,3facher Vergrößerung digitalisiert (Leica Z6 Apo A und Leica DFC 420, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und im TIF-Format gespeichert (Abb. 34-41, Abschnitt 8.2). Dann wurden die einzelnen Gewebeanteile im Bohrlochquerschnitt (Weichteilgewebe, neugebildetes Knochengewebe und Implantat) farbig markiert (Adobe Photoshop Elements 9, Adobe Systems GmbH, München, Deutschland). Die Bestimmung der absoluten Flächenanteile der genannten Komponenten erfolgte mittels eines Programms zur quantitativen Bildanalyse (Leica QWin, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Analysiert wurde je ein Schnitt aus Ebene A und Ebene B. Anschließend wurden die Messwerte in relative Zahlenwerte konvertiert.

3.5.2 Histologie

3.5.2.1 Qualitative Untersuchung

Zunächst wurde eine qualitative Untersuchung der in van Kossa/McNeal und in Toluidinblau gefärbten Dünnschnitte durchgeführt. Knochen- und Implantatstruktur wurden beschrieben.

3.5.2.2 Semiquantitative Untersuchung

Anschließend erfolgte die semiquantitative Bestimmung der Flächenanteile des neugebildeten Knochens, Implantats und Weichteilgewebes am Bohrloch. Geschätzt wurden die Anteile dabei für das Bohrloch gesamt und in drei Zonen innerhalb konzentrischer Ringe im Bohrloch (Abb.3). Bei der Gesamtbetrachtung der Flächenanteile am Bohrloch wurde das Weichteilgewebe zusätzlich nach seiner Zusammensetzung aus Granulations-, Fett- oder Bindegewebe aufgeschlüsselt.

3.5.2.3 Zellzahlbestimmung

Anschließend erfolgte bei 20facher Vergrößerung die Zählung der Zellen des Abwehrsystems. In jedem Schnitt wurden folgende Zelltypen in vier Zonen gezählt: Osteoklasten, Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen und lymphoplasmazelluläre Zellen (Abb. 4). Mehrkernige Riesenzellen die im Weichteilgewebe oder auf dem Implantat zu finden waren, wurden als Fremdkörperriesenzellen und solche die auf den Oberflächen der Knochentrabekel angesiedelt waren als Osteoklasten gezählt.

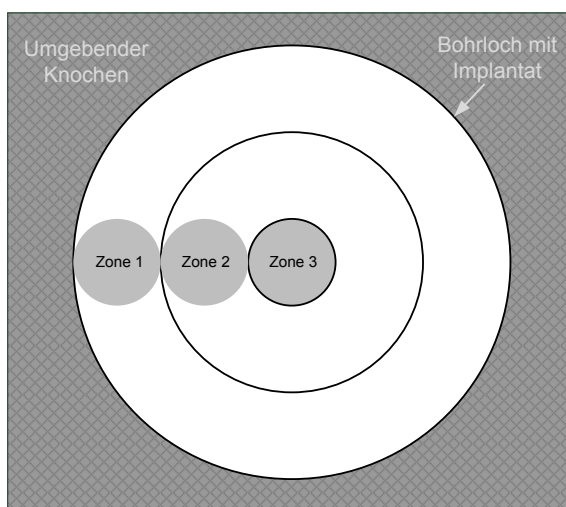


Abb. 3: Auswertungsbereiche für die semiquantitative Schätzung der Flächenanteile

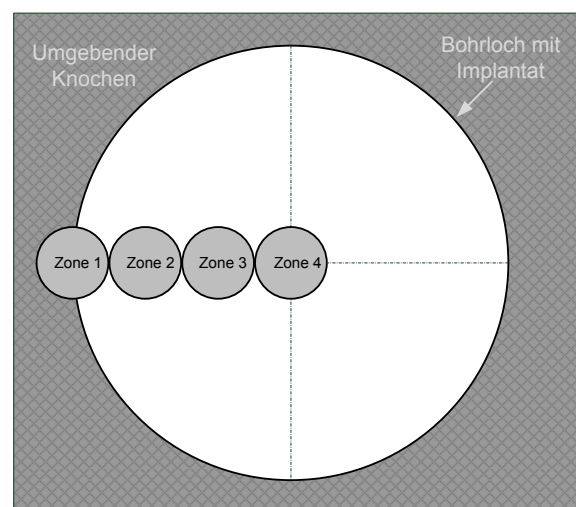


Abb. 4: Gesichtsfelder für die Zellzählung

3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzschnitte wurden fotografiert und digitalisiert (Leica CTR 6000 und Leica DFC 320, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland; Leica Application Suite, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Deutschland; Abb. 26-33, Abschnitt 8.2). Auf eine Auswertung wurde in dieser Arbeit verzichtet.

3.5.4 Statistische Untersuchung der Ergebnisse

Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse wurden bestimmt. Die Ergebnisse der semiquantitativen und histomorphometrischen Untersuchungen sowie die in den Untersuchungen zu Zellgehalt und Verteilung erzielten Werte wurden gesamthaft einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen (SPSS Statistics, Version 19, IBM). Ein Post Hoc Test nach Scheffe wurde durchgeführt um individuelle Unterschiede zwischen den Gruppen auf ihre Signifikanz zu prüfen. Für die Ergebnisse der Untersuchungen zu Zellgehalt und Verteilung wurde zusätzlich der Post Hoc Test nach Bonferroni durchgeführt. Für den Vergleich der Zellen in den verschiedenen Zonen wurde zusätzlich eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen (ANOVA for repeated measures, Roy's Largest Root) durchgeführt. Unterschiede zwischen den Ergebnissen mit einem Signifikanzwert (p-Wert) kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant eingestuft. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson wurden für die Ergebnisse der semiquantitativen Untersuchung, der histomorphometrischen Untersuchung in Ebene B und die Gesamtzellzahlen aus der Untersuchung zu Zellgehalt und Verteilung berechnet.

3.5.5 Diffraktometrie der DCP- Proben (M7)

Jeweils eine Probe der Biomaterials M7 aus der zwei, vier und der acht Wochen Gruppe wurde, eingebettet in Polymethylmethacrylat, weiter untersucht. Die kristalline Struktur der Proben wurden röntgendiffraktometrisch bestimmt (Panalytical X'Pert Pro, Panalytical, Almelo, Niederlande; RMS Foundation, Bettlach, Schweiz). Die Analyse wurde durchgeführt von Nicola Döbelin (RMS Foundation, Bismattstraße 12, 2544 Bettlach, Schweiz). Ein detaillierter Bericht zu Analyse und Ergebnissen findet sich in Abschnitt 8.3.2.

4 Resultate

4.1 Operation

Alle Narkosen verliefen ohne Zwischenfälle und wurden von den Tieren gut überstanden. Eine Probe des Materials M2 konnte, aufgrund der Fehlpositionierung des für die Implantation vorgesehenen Bohrlochs an der Position „Humerus distal links“ bei dem Schaf mit der Nummer neun, nicht eingesetzt werden. Insgesamt nutzten wir sieben Ersatzproben der Gruppen M2, M3 (2), M4 (3) und M7. Bei drei Proben der Gruppen M2, M4 und M1 brach der laterale Teil der Probe während der Implantation ab. Dieser wurde der implantierten Probe deckelförmig aufgesetzt und durch den Wundverschluss in seiner Position fixiert. Bei Schaf sieben wurde beim Bohren des Loches am distalen Femur das rechte Kniegelenk eröffnet. Die Gelenkkapsel wurde mit einem Polydioxanonfaden (Ethicon PDS II, 0, Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien) verschlossen. Der Zugang zum rechten proximalen Femur bei Schaf sechs wurde zunächst zu weit caudal angelegt. Er musste daraufhin wieder verschlossen und an der korrekten Position erneut angelegt werden.

4.2 Postoperative Phase

Postoperativ kontrollierten wir das Allgemeinbefinden und den klinischen Zustand aller Tiere zwei Mal täglich. Außer bei einem Schaf gab es keine Komplikationen während der Erholungsphase von Operation und Narkose. Das Tier mit der Nummer 14 zeigte elf Tage nach der Operation eine mittelschwere Lahmheit. Kontrollröntgenbilder in zwei Ebenen, ein Hämatogramm und eine blutchemische Untersuchung wurden daraufhin angefertigt und ergaben keinen besonderen Befund. Eine analgetische Versorgung des Tieres mit Carprofen (4mg/kg KGW) führte zur Linderung der Symptome. Die Schlachtung des Tieres erfolgte planmäßig drei Tage nach dem Auftreten der Lahmheit. Post mortem konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Bei einigen Tieren entstanden Serome im Wundbereich welche sich im Laufe der Heilungsphase zurück bildeten. Das Allgemeinbefinden der betroffenen Tiere war jedoch zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt.

4.3 Probengewinnung und -aufbereitung

Nach der Schlachtung wurden die Implantate in dem sie umgebenden Knochen mit einer Bandsäge quaderförmig ausgesägt. Dabei wurden einige der Probenzylinder

oberflächlich angeschnitten und drei Implantate zerteilt. Im Einbettungsprozess wurden diese Implantate wieder zusammengefügt. Ansonsten verliefen Probengewinnung und -aufbereitung ohne besondere Vorkommnisse.

4.4 Makroskopische Untersuchung und Radiografie

Zum Zeitpunkt der Explantation der Knochen waren die Biomaterialien gut in das umliegende Gewebe integriert und lateral mittel- bis hochgradig bindegewebig verwachsen. Nach Präparation der Weichteile konnten die Implantationsorte der meisten Proben lokalisiert werden. Auf eine Auswertung der post mortem angefertigten Röntgenbilder wurde verzichtet, da keine relevanten Gruppenunterschiede zu erwarten waren. Die Aufnahmen dienten der Lokalisation der Implantate im Knochen um deren Rückgewinnung zu erleichtern.

4.5 Histologie

Abbildungen 42-46 zu den beschriebenen Vorgängen finden sich in Abschnitt 8.2 (Abb. 42-46).

4.5.1 Qualitative Untersuchung

4.5.1.1 M1 (hohe Mikroporosität und kleine Korngröße)

In den Schnitten der zwei Wochen Gruppe wuchsen zarte Knochentrabekel vom äußeren Defektrand her in das Bohrloch ein. Die Implantatstruktur im äußeren Ring des Bohrlochs war kleinkörnig und nicht zusammenhängend. Häufig umgab ein ringförmiger schmaler Saum aus Granulationsgewebe den inneren Implantatkern. Die Implantatstruktur im inneren Bereich des Bohrlochs war erhalten und die Makroporen des Implantats waren mit Granulationsgewebe ausgefüllt. Nach vier Wochen waren zusätzlich zu den von außen einwachsenden Knochentrabekeln diffuse Mineralisationsherde bis ins Zentrum des Defektes vorhanden. Der neugebildete Knochen zeigte häufig eine unregelmäßige innere Struktur, in die feinkörnige Implantatreste eingeschlossen waren. In je einem der sechs untersuchten Schnitte dieser Zeitgruppe war kaum neugebildeter Knochen nachweisbar, beziehungsweise der Defekt mit einer Trabekelstruktur komplett ausgefüllt. Im Zentrum des Bohrlochquerschnitts waren nur wenige Implantatreste nachweisbar. Nach acht Wochen war der Defekt gut durchbaut mit Knochentrabekeln, welche bis ins Bohrlochzentrum vorgedrungen waren.

Die Trabekelstruktur war nicht regelmäßig, denn es fanden sich neben dichten, im Vergleich zum umgebenden Knochen sklerotischen, Stellen auch lochförmige mit Fettgewebe gefüllte Aussparungen des Trabekelgerüsts. Im Weichteilgewebe waren nach acht Wochen kaum Implantatrete vorhanden. Sie waren in erster Linie in die Trabekelstruktur integriert. Die interne Knochenstruktur war in den Zonen der Knochenneubildung und anliegend an eingeschlossene Implantatspuren unregelmäßig.

4.5.1.2 M2 (hohe Mikroporosität und große Korngröße)

Nach zwei Wochen war zartes ringförmiges Knochenwachstum vom äußeren Rand des Implantats ausgehend nachweisbar. Die Implantatstruktur war nicht an allen Stellen erhalten oder teilweise körnig und zusammenhangslos. Im Vergleich zu M1 war die Auflösung der Implantatstruktur weniger ausgeprägt. Erhaltene Makroporen waren mit knotigen Granulationsgewebs- und Osteoblastenstrukturen ausgefüllt. Nach vier Wochen erfolgte die Bildung dichter, kräftiger Trabekelstrukturen ringförmig von außen. Einer der Dünnschnitte war bis ins Zentrum durchbaut. In die Knochenbälkchen waren vor allem im Randbereich blasig erscheinende Implantatspuren integriert. Feine Implantatrete lagen außerdem diffus verteilt im unstrukturierten Granulationsgewebe in der äußeren Zone des Bohrlochs. Nach acht Wochen war das Bohrloch meist komplett ausgefüllt mit Knochen trabekeln. Deren Wachstumsmuster und Strukturen nicht immer gleichmäßig waren, sondern teilweise nahezu sklerotisch oder besonders locker verteilt. Implantatrete waren nur eingeschlossen in die Trabekelstruktur vorhanden und hatten hier ein blasiges Erscheinungsbild. Die interne Knochenstruktur war im jungen Knochengewebe und in der Nähe der Implantateinschlüsse unregelmäßig.

4.5.1.3 M3 (geringe Mikroporosität und kleine Korngröße)

Die Implantatstruktur war nach zwei Wochen gut erhalten. Osteoid bildete sich außen und auch zentral waren schon sichelförmige Osteoidauflagerungen auf die Implantatstruktur sichtbar. Die Makroporen waren mit knotigen Granulationsgewebs- und Osteoblastenstrukturen ausgefüllt. Nach vier Wochen ergab sich ein regelmäßiges Bild der Knochenbildung. Im Randbereich des Defektes war bereits ein dichtes Trabekelgeflecht entstanden und über den Bohrlochquerschnitt hinweg waren bis ins Zentrum des Querschnitts diffus sichelförmige Ossifikationsherde sichtbar. Sie waren auf die Implantatoberfläche aufgelagert. Das Granulationsgewebe war knotig in der

Porenstruktur des Implantats organisiert. Nach acht Wochen waren die mit dem Implantat M3 ausgefüllten Defekte mit einer regelmäßigen und dichten Trabekelstruktur durchbaut. Insgesamt schien die Trabekelstruktur dichter als die des umliegenden Knochens.

4.5.1.4 M4 (geringe Mikroporosität und große Korngröße)

Nach zwei Wochen waren Ansätze des Knochenwachstums teilweise bis zu $\frac{3}{5}$ des Defektradius vorgedrungen. Ein wenig Osteoidbildung war auch zentral nachweisbar. Die Struktur des Implantats schien regelmäßig und gut erhalten und dessen Makroporen waren ausgefüllt mit knotig organisiertem Granulationsgewebe. Nach vier Wochen war ein ringförmiges Trabekelwachstum vom äußeren Defektrand her zu beobachten. Zusätzlich waren regelmäßig, diffus verteilte sichelförmige Knochenbildungszentren über den restlichen Bohrlochquerschnitt in den Makroporen des Implantats sichtbar. Das Granulationsgewebe war nestförmig integriert in diese Gesamtstruktur. Nach acht Wochen war der Defekt insgesamt gut mit Knochenbälkchen durchbaut. Nur in einem von sechs Schnitten war die Trabekelstruktur nicht bis zentral vorgedrungen. In diesem Fall erfolgte das Knochenwachstum konzentrisch von außen und diese neugebildeten Strukturen umgaben einen unstrukturierten Granulationsgewebekern. Insgesamt waren die Knochenbälkchen relativ regelmäßig strukturiert. Teile des Implantats waren in die knöcherne Struktur integriert und die interne Knochenstruktur war in diesen Bereichen etwas unruhiger. In den reiferen äußeren Bereichen des Bohrlochs waren keine Implantateinschlüsse erkennbar.

4.5.1.5 M5 (cyclOS)

Nach zwei Wochen war das Implantat bei der Hälfte der untersuchten Schnitte präparationsbedingt fast vollständig herausgelöst. Bei den anderen Schnitten bildeten sich vom Defektrand ausgehend zarte Osteoidstrukturen. Die Implantatstruktur war gut erhalten und die Makroporen waren gefüllt mit knotigen Granulationsgewebsstrukturen. In den Schnitten der vier Wochen Gruppe bildeten sich unregelmäßig vom Bohrlochrand ausgehende Knochentrabekel. In einem der sechs untersuchten Dünnschnitte fanden sich zentral sichelförmige Ossifikationszentren aufgelagert auf die Implantatstruktur. Implantatreste waren diffus verteilt über das Bohrloch und eine zusammenhängende Struktur war nicht nachweisbar. Nach acht Wochen zeigten die untersuchten Schnitte ein homogenes Bild. Diffus über den Defekt verteilt hatten sich

dicke halbmondförmige Knochenstrukturen gebildet, welche sich an die diffus verteilten Implantatreste anlagerten. Im Randbereich des Bohrlochs vernetzen diese sichelförmigen Knochenstrukturen untereinander. Implantatreste waren in diese Gesamtstruktur integriert.

4.5.1.6 M6 (turbOS)

Nach zwei Wochen waren im Randbereich des Defektes einige Osteoidherde sichtbar. Zentral war die Implantatstruktur sehr gut erhalten, in den Randbereichen hatte das Implantat häufig eine körnige, zusammenhangslose Struktur. Die Makroporen des Implantats waren ausgefüllt mit Granulationsgewebe. Nach vier Wochen konnte ossifizierter Knochen vor allem in den Randbereichen nachgewiesen werden. Zusätzlich waren Ossifikationsherde unregelmäßig diffus über das Bohrloch verteilt. In den Dünnschnitten der acht Wochen Gruppe war der Defekt zentral nur in einer von sechs untersuchten Proben mit Ossifikationsherden durchsetzt, welche nicht zu Trabekelstrukturen vernetzt waren. In den anderen Schnitten befand sich der größte Anteil des neuen Knochengewebes in den äußeren Bereichen des Bohrlochquerschnitts. Diese Trabekelstrukturen waren teils locker und teils sklerotisch im Vergleich zum umliegenden Knochengewebe. In einem von sechs Schnitten befand sich im Zentrum eine zusammenhängende Implantatstruktur. In den Randbereichen des Bohrloch befanden sich in allen Schnitten Implantatreste an die Ossifikationsherde angelagert waren. In einigen Schnitten konnten zentral unstrukturierte Granulationsgewebs- bzw. Bindegewebsstrukturen nachgewiesen werden. Implantatreste konnten in diesen Bereichen nicht nachgewiesen werden.

4.5.1.7 M7 (DCP)

Das Implantat war in fünf von sechs Präparaten der zwei Wochen Gruppe fast vollständig herausgelöst. Im Randbereich dieser Schnitte waren knotige Granulationsgewebsstrukturen sowie Ansätze leichter trabekelförmiger Osteoidbildung sichtbar. In einem Fall war das Implantat erhalten. Die Implantatstruktur war zusammenhängend und Granulationsgewebe füllte diese Struktur aus. Es war keine Osteoidbildung im Defekt nachweisbar. In den vier und acht Wochen Gruppen waren die Implantate und die umgebenden Bohrlochinhalte präparationsbedingt herausgebrochen. Beurteilbar war jeweils nur ein schmaler Randbereich, in dem Trabekelstrukturen und Granulationsgewebe nachweisbar waren.

4.5.1.8 M8 (cyclOS; Granulat: 1,4- 2,8mm)

Nach zwei Wochen hatte sich Osteoid vom umliegenden Knochen ausgehend gebildet. Reste des Implantats waren unregelmäßig über den Schnitt verteilt und waren fokale inselförmig im Granulationsgewebe gelagert. In diesen Bereichen waren die Makroporen des Implantats ausgefüllt mit Granulationsgewebe. Nach vier Wochen war fokales unregelmäßiges Knochenwachstum nachweisbar. Das Granulationsgewebe war größtenteils unstrukturiert und umschloss Inseln mit sichelförmigen Ossifikationsherden und Implantatresten. Nach dieser Zeit war eine der sechs Proben gut durchbaut mit Knochenbälkchen bzw. Osteoidstrukturen. Nach acht Wochen ergab sich ein ungleichmäßiges Bild des Knochenwachstums, welches in erster Linie vom Defektrand ausging. Insgesamt waren zwei von sechs Dünnschnitten mit Knochen ausgefüllt. Die anderen waren zentral kaum knöchern durchbaut. In diesen Bereichen fanden sich zentral oder dezentral isoliert Knocheninseln mit teilweise sklerotischer Knochenstruktur. Sie waren größtenteils in Fettgewebe eingebettet.

4.5.2 Semiquantitative Untersuchungen

4.5.2.1 Schätzung der Flächenanteile der Komponenten neugebildeter Knochen, Implantat und Weichteilgewebe am Bohrlochquerschnitt

In der semiquantitativen Untersuchung wurden die relativen Anteile der Komponenten neugebildeter Knochen, Implantat und Weichteilgewebe am Bohrdefekt (100%) geschätzt. Die Tabellen 5-8 (Abschnitt 8.1.1) fassen die Ergebnisse zusammen. Für das Biomaterial M7 erfolgte die Schätzung der Flächenanteile anhand der Dickschnitte.

4.5.2.1.1 Neugebildeter Knochen

Nach zwei Wochen wurden die höchsten Anteile neugebildeten Knochens am Bohrloch für die Biomaterialien M3 (8,17%) und M4 (7%) gemessen. Der niedrigste Wert lag bei 2,83% und wurde bestimmt für das Material M7. Für die anderen Stoffe betrug der Anteil des neugebildeten Knochens zwischen 3,6% und 6,6%. Den höchsten Anteil neugebildeten Knochens nach vier Wochen hatten die Materialien M4 (30,8%) und M1 (27,5%). Der niedrigste Anteil konnte für die Keramik M6 gemessen werden und betrug 7,83%. Für die anderen Biomaterialien wurden Werte zwischen 13% und 21,3% bestimmt. In der acht Wochen Gruppe konnten die größten Werte für M3 (45%), M2 (43,33%) und M4 (42,5%) gemessen werden und der niedrigste Wert, das Ergebnis des

Biomaterials M5, betrug 17,33%. Mittlere Werte zwischen 17,8% und 31,3% konnten für die anderen Materialien bestimmt werden. Signifikante Unterschiede konnten in keiner der Zeitgruppen nachgewiesen werden. Die Menge des neugebildeten Knochens war negativ mit dem Anteil des Implantats ($p=0,000$) und des Weichteilgewebes ($p=0,000$) korreliert.

4.5.2.1.2 *Implantat*

Nach zwei Wochen konnte für die Biokeramik M7 (41,7%) der höchste Implantatgehalt nachgewiesen werden. Dieser Wert war signifikant höher ($p=0,000-0,024$) als die für M1-M4, M6 und M8 gemessenen Werte. Besonders ausgeprägt war die Signifikanz der Unterschiede gegenüber M1, M2, M4 und M8. Die niedrigsten Werte wurden für M8 (15,83%) und M4 (16,17%) gemessen. Die Ergebnisse der anderen Biomaterialien lagen zwischen 17,7 % und 25% ($M5>M6>M2>M3>M1$). Auch nach vierwöchiger Implantation der Biomaterialien konnte für das Material M7 der größte Implantatgehalt (35,4%) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterschied sich signifikant von den für M1- M4 und M8 gemessenen Werten ($p=0,000-0,008$). Gegenüber den Werten von M1, M2, M4 und M8 war die Signifikanz besonders ausgeprägt. Die niedrigsten Ergebnisse wurden für M1 (6,17%) und M8 (7,83%) ermittelt. Für alle weiteren Biomaterialien wurden Werte zwischen 18,2% und 9,3% bestimmt ($M6>M5>M3>M4>M2$). Nach acht Wochen konnte der höchste Implantatgehalt mit 23,8% für M7 ermittelt werden. Die niedrigsten Werte wurden für M1 (2,5%) und M8 (3,7%) gemessen. Die anderen untersuchten Materialien erzielten Ergebnisse zwischen 10,4% und 5,5% ($M5>M3>M6>M4>M2$). In dieser Zeitgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Für alle Materialien konnte mit zunehmender Zeit eine kontinuierliche Abnahme der Implantatsubstanz nachgewiesen werden.

4.5.2.1.3 *Weichteilgewebe*

Nach einem Zeitraum von vier Wochen wurde der höchste Weichteilgehalt für das Biomaterial M1 (78,3%) ermittelt. Abgesehen vom Ergebnis des Materials M7 (56%), welches am niedrigsten war, lagen die Werte der anderen Stoffe zwischen 71,4% und 77,3%. Nach vier Wochen wurde der höchste Weichteilgehalt für M8 (76,7%) nachgewiesen und der niedrigste Wert konnte für die Materialien M4 (56,3%) und M7 (56,8%) bestimmt werden. Die übrigen Ergebnisse lagen zwischen 66% und 69,5%. Die

höchsten Weichteilgewebsanteile in der acht Wochen Gruppe wurden bestimmt für die Biomaterialien M8 (74,7%), M6 (73%) und M5 (72,3%). Der niedrigste Wert war 45% (M3). Nach achtwöchiger Implantationsdauer wurden für die anderen Keramiken Weichteilgewebsanteile zwischen 51% und 66,2% ermittelt. Der Weichteilgewebsanteil sank konstant über die Beobachtungszeiträume für die Biomaterialien M1 bis M4 und blieb für die Materialien M8 und M7 etwa konstant. Nach Implantation der Keramiken M5 und M6 sank der nach zwei Wochen ermittelte Bindegewebsanteil zunächst nach vier Wochen ab um dann nach einem Zeitraum von acht Wochen wieder auf einen Wert ähnlich dem Ausgangswert anzusteigen. Signifikante Unterschiede konnten in keiner der Zeitgruppen nachgewiesen werden.

4.5.2.2 Schätzung der Flächenanteile der Komponenten neugebildeter Knochen, Implantat und Weichteilgewebe in den Zonen Z1 bis Z3

Diese Anteile der Komponenten Neugebildeter Knochen, Implantat und Weichteilgewebe wurden zusätzlich in drei Zonen (Z1- Z3; Abb. 2, Abschnitt 3.5.2.3.) innerhalb des Defektes bestimmt (Tab.8, Abschnitt 8.1.1).

4.5.2.2.1 *Neugebildeter Knochen*

Nach zwei Wochen hatte sich neues Knochengewebe vor allem im äußeren Bereich des Defektes (Zone 1) gebildet. In der Zone 2 war für die Materialien M2, M4 und M5 keine Knochenbildung nachweisbar. Im Zentrum des Defekts (Zone 3) konnte nur für die Biomaterialien M1 und M3 Knochenwachstum nachgewiesen werden. Der höchste Gehalt neugebildeten Knochengewebes konnte in allen drei Zonen für Material M3 bestimmt werden. Nach einem Zeitraum von vier Wochen hatten alle Materialien in den verschiedenen Zonen Knochen angebildet. Die Knochenmasse war am höchsten im äußeren Bereich, kleiner in der Zone 2 und am geringsten in der Zone 3. In der äußeren Zone konnte der höchste prozentuale Anteil für das Material M1 bestimmt werden. Für Material M4 war der Knochengehalt in den Zonen 2 und 3 am höchsten. Auch nach acht Wochen war der Anteil des neugebildeten Knochens in der äußeren Zone höher als in der Zone 3. Die Differenz zwischen den Zonen nahm jedoch ab. In allen drei Untersuchungsbereichen wurden die höchsten Knochengehalte nachgewiesen für M2, M3 und M4.

4.5.2.2.2 Implantat

Nach zwei Wochen wurde der geringste Implantatgehalt in der äußeren Zone (Z1) nachgewiesen. Der Gehalt war höher in der Zone 2 und am höchsten in der Zone 3. Die einzige Ausnahme von dieser Regel bildete das Material M8. Hier war der Implantatgehalt in der Zone 2 am höchsten und in der Zone 3 am niedrigsten. Auch nach vier und nach acht Wochen waren die Implantatgehalte in der inneren Zone tendenziell am höchsten und im äußeren Bereich am niedrigsten. Zu jedem Zeitpunkt waren die Ergebnisse für M7 höher als die für die anderen Biomaterialien bestimmten Werte.

4.5.2.2.3 Weichteilgewebe

Eine tendenzielle Zunahme des Weichteilgehalts zwischen der äußeren und der inneren Zone des Defekts war nach zwei, vier und acht Wochen zu beobachten. Für das Biomaterial M8 wurden in jeder Zeitgruppe die höchsten bzw. zweithöchsten Weichteilgewebsgehalte bestimmt.

4.5.2.3 Zusammensetzung des Weichteilgewebes

Die Zusammensetzung des Weichteilgewebes wurde anteilmäßig aufgeschlüsselt. Unterschieden wurde zwischen den Komponenten Granulationsgewebe, Fettgewebe und Bindegewebe. Tabelle 9 (Abschnitt 8.1.1) zeigt eine Übersicht der ermittelten Ergebnisse. Diese Untersuchung konnte für das Material M7 nicht durchgeführt werden. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen für die einzelnen Biomaterialien waren innerhalb der untersuchten Zeitgruppen nicht signifikant.

4.5.2.3.1 Granulationsgewebe

Der höchste Granulationsgewebsanteil in der zwei Wochen Gruppe wurde für das Biomaterial M1 (77,3%) ermittelt. Der niedrigste Wert wurde für das Material M8 (67,3%) beschrieben. Alle anderen Materialien hatten Granulationsgewebsanteile zwischen 70,8% und 76,8%. In der vier Wochen Gruppe lag der Granulationsgewebsanteil zwischen 61,3% (M1) und 44,7% (M4). Nach acht Wochen konnte der höchste Granulationsgewebsanteil für das Biomaterial M5 ermittelt werden. Er lag bei 28,2%. Die niedrigsten Granulationsgewebsanteile am Bohrloch wurden für die Materialien M3 (7%) und M4 (9,7%) bestimmt. Für die anderen Biomaterialien ergaben sich Werte zwischen 11,7% und 18,3%. Der Anteil des Granulationsgewebes

am Weichteilgewebe verringerte sich für alle untersuchten Biomaterialien konstant über die untersuchten Zeitpunkte hinweg.

4.5.2.3.2 Fettgewebe

Ein Fettgewebsanteil am Bindegewebe konnte in der zwei Wochen Gruppe nur für das Biomaterial M6 (1,7%) ermittelt werden. Nach vier Wochen wurde für jedes der untersuchten Materialien ein Fettgewebsanteil ermittelt. Dieser lag zwischen 13,3% (M8) und 2,1% (M3). Den zweithöchsten Wert erreichte das Biomaterial M4 (11,7%). Nach acht Wochen wurden die höchsten Fettgewebsanteile beschrieben für die Biokeramiken M8 (50,8%), M1 (48,7%) und M6 (48%). Am niedrigsten war der Wert für das Material M3 mit 32%. Die anderen Materialien hatten Fettgewebsanteile am Bohrloch zwischen 37% und 44,2%. Der Fettgewebsanteil stieg für alle Biomaterialien konstant über die untersuchten Zeitpunkte an. Während nach zwei Wochen praktisch kein Fettgewebe im Defektbereich nachweisbar war, nahm das Fettgewebe nach acht Wochen bis zu 50,8% der Bohrlochquerschnitts ein.

4.5.2.3.3 Bindegewebe

In der zwei Wochen Gruppe konnte für die Materialien M8 (10%) und M6 (3,3%) ein Bindegewebsanteil ermittelt werden. In der vier Wochen Gruppe konnte für alle Biomaterialien außer M4 ein Bindegewebsanteil ermittelt werden. Dieser lag zwischen 0,8% (M1/M2) und 13,8% (M6). Nach einem Zeitraum von acht Wochen wurde für alle Materialien außer für M5 ein Bindegewebsanteil am Bohrlochquerschnitt bestimmt. Dieser Anteil lag zwischen 7,7% (M8) bzw. 7% (M3) und 2,5% (M2). Der Bindegewebsanteil am Bohrdefekt stieg für die Materialien M1 bis M4 bis zum letzten beobachteten Zeitpunkt an. Für Material M5 und M6 war der Anteil nach vier Wochen am höchsten und sank dann bis zum Zeitpunkt von acht Wochen wieder ab. Das Biomaterial M8 war das einzige Material für welches der Bindegewebsanteil nach zwei Wochen am höchsten war und dann kontinuierlich über die beobachteten Zeitpunkte sank.

4.5.3 Untersuchung zu Zellgehalt und -verteilung

Folgende Zelltypen wurden bei 20facher Vergrößerung in vier Zonen (Abb.3, Abschnitt 3.5.2.3.) gezählt: Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen, Osteoklasten und, zusammengefasst, Lymphozyten und Plasmazellen (Abb. 47-49, Abschnitt 8.2). Die

Ergebnisse sind tabellarisch im Abschnitt 8.1.2 (Tab. 10-13) aufgeführt. Angegeben werden die Gruppenmittelwerte als absolute Zahlen.

4.5.3.1 Überblick über die Gesamtzellzahlen

Für die Ermittlung der Gesamtzellzahlen eines Biomaterials wurden jeweils die Mittelwerte aus den untersuchten vier Zonen summiert (Tab. 10, Abschnitt 8.1.2).

4.5.3.1.1 Fremdkörperriesenzellen

Nach zwei Wochen konnten für die verschiedenen Materialien zwischen 6,3 (M4, M8) und 32 (M5) bzw. 27,2 (M6) Fremdkörperriesenzellen gezählt werden. Die für die anderen Biokeramiken bestimmten Werte lagen in einem mittleren Bereich zwischen 12 (M2) und 19,8 (M1). Die Untersuchung der Zellzahl in der vier Wochen Gruppe ergab Zellzahlen zwischen 6,4 (M5) und 16,8 (M1). Den höchsten Wert jedoch bildete das Ergebnis für das Biomaterial M2. Für dieses Biomaterial wurden 29,3 Zellen gezählt. Dies bedeutete einen starken Anstieg (+17,3) der Fremdkörperriesenzellzahl für dieses Material. Für die anderen Biomaterialien war die Zahl der Fremdkörperriesenzellen zwischen zwei und vier Wochen entweder abgesunken (M1, M3, M5, M6) oder geringgradig angestiegen (M4, M7, M8). In der acht Wochen Gruppe konnten zwischen 0,3 (M2) und 3,3 (M1) Fremdkörperriesenzellen gezählt werden. Den höchsten Wert erzielte jedoch, davon abweichend, M6 (9,3). Für jedes Material bedeutete dies eine Reduktion der Zellzahl gegenüber den Ergebnissen nach zwei und vier Wochen. Insgesamt wurden nach acht Wochen die tiefsten Zahlenwerte erreicht.

4.5.3.1.2 Makrophagen

Zwischen 20,3 (M3) und 26,5 (M8) Makrophagen konnten nach zwei Wochen für alle Materialien, außer M1 (35), gezählt werden. Nach vier Wochen war die Makrophagenzellzahl für M8 (33,5) und M3 (33,2) gegenüber der zwei Wochen Gruppe deutlich angestiegen. Die Ergebnisse der anderen Biomaterialien lagen zwischen 19,3 (M6) und 24 (M2). Nach acht Wochen wurden die höchsten Werte durch die Materialien M7 (41,8) und M8 (30,7) erzielt. Die tiefsten Zellzahlen erreichten M1 (11,2) und M2 (9,7). Die Ergebnisse der anderen Biomaterialien lagen zwischen 16,7 (M6) und 23,3 (M5).

4.5.3.1.3 Osteoklasten

Nach zwei Wochen konnten zwischen 3,3 (M5) und 8 (M3) Osteoklasten gezählt werden. Für jedes Material war nach Ablauf von vier Wochen ein Anstieg der Osteoklastenzahl zu verzeichnen. Zwischen vier und acht Wochen folgte ein weiterer Anstieg für alle Biomaterialien. Die Osteoklastenzahlen lagen dann zwischen 8,2 (M5) und 11,8 (M3).

4.5.3.1.4 Lymphozyten und Plasmazellen

Die höchsten Zahlen von Lymphozyten und Plasmazellen wurden nach zwei Wochen durch M3 (81,8) und M5 (65) erreicht. Die niedrigsten Zellzahlen wurden für die Materialien M7 (22,3) und M8 (17,5) bestimmt. Die Werte für die anderen untersuchten Biokeramiken lagen zwischen 28,2 (M6) und 39 (M4). Nach vier Wochen war die Zellzahl für M2- M4, M5, M7 und M8 gegenüber der zwei Wochen Gruppe gesunken. Sie lag zwischen 11,8 (M7) und 28,8 (M3, M5) Zellen. Für M1 und M6 war nach vier Wochen ein Anstieg der Zellzahl (44,2/ 42,5) gegenüber der zwei Woche Gruppe zu verzeichnen. Nach acht Wochen lagen die höchsten Werte bei 49,8 (M7) und bei 36 (M6). Für die anderen Biomaterialien wurden Lymphozyten- und Plasmazellgehalte zwischen 3,4 (M3) und 27,5 (M8) ermittelt.

4.5.3.1.5 Korrelationen

Die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab, dass die Zahl der Fremdkörperriesenzellen positiv mit der Zahl der Makrophagen korreliert war. Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und die lymphoplasmazellulären Zellen korrelierten negativ mit der Zahl der Osteoklasten (Tab. 11, Abschnitt 8.1.2).

4.5.3.2 Verteilung der Zelltypen in den Zonen Z1 bis Z4

4.5.3.2.1 Fremdkörperriesenzellen

Nach zwei Wochen konnte tendenziell eine Abnahme der Fremdkörperriesenzellen zwischen den Zonen 1 und 4 beobachtet werden. Eine Ausnahme bildete das Biomaterial M8. Für diese Biokeramik gab es eine tendenzielle Zunahme der Fremdkörperriesenzellen von außen nach innen, von Zone 1 zu Zone 4. Nach vier Wochen konnte für alle Materialien eine tendenzielle Zunahme der Fremdkörperriesenzellen zwischen dem Bohrlochrandbereich und dessen Mitte festgestellt werden.

Besonders stark war diese Tendenz für das Biomaterial M2 (Z1: 2,8; Z4: 13,3). Nach acht Wochen konnten insgesamt sehr geringe Fremdkörperriesenzellzahlen ermittelt werden. Sie lagen für alle Materialien in den Zonen 1 bis 4 zwischen 0 und 1,4. Die einzige Ausnahme bildete die für das Material M6 in der Zone 3 gemessene Zellzahl von 6,7. Der multivariate Varianztest zeigte Unterschiede zwischen den einzelnen Zonen ($p=0,000$; Teststärke=1,0) und zwischen den verschiedenen Biomaterialien in den untersuchten Zonen zu den verschiedenen Zeitpunkten ($p=0,050$; Teststärke=0,949). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten waren nicht signifikant in den Tests nach Scheffe und Bonferroni.

4.5.3.2.2 Makrophagen

Nach zwei Wochen wurden zwischen 3,7 (M3, Z3) und 10,5 (M8, Z2) Makrophagen für die einzelnen Materialien in den verschiedenen Zonen gezählt. Tendenziell waren die Makrophagenzahlen bei allen untersuchten Biomaterialien in der Bohrlochmitte niedriger. In der vier Wochen Gruppe war die Verteilung der Makrophagen zwischen den einzelnen Zonen für die verschiedenen Materialien relativ ausgeglichen. Die Zellzahlen lagen zwischen 3,4 (M5, Z1) und 10,8 (M8, Z2). Nach acht Wochen waren die Makrophagenzahlen in den inneren Zonen tendenziell höher als in den äußeren. Die höchsten Werte erzielten M7 und M8 in den inneren Zonen (M7: Z2:12,8, Z3:14,4, Z4:12; M8: Z3: 11). Für die anderen Biomaterialien lag die Makrophagenzahl nach acht Wochen zwischen 0,3 (M1, Z1) und 10,5 (M5, Z4). Der multivariate Varianztest zeigte Unterschiede zwischen den einzelnen Zonen ($p=0,000$; Teststärke=1,0) und zwischen den verschiedenen Biomaterialien in den einzelnen Zonen zu den verschiedenen Zeitpunkten ($p=0,000$; Teststärke=0,999). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten waren nicht signifikant in den Tests nach Scheffe und Bonferroni.

4.5.3.2.3 Osteoklasten

Für alle untersuchten Biomaterialien nahm die Osteoklastenzahl nach zwei Wochen vom Bohrlochrand zu dessen Zentrum hin ab. Während in Zone 1 zwischen 2,5 (M8) und 5,8 (M1) Osteoklasten nachweisbar waren, waren es in Zone 2 0,5 (M2, M5) bis 3,3 (M7) und in den Zonen 3 und 4 nur zwischen 0 und 0,3 Zellen. Diese abnehmende Tendenz der Zellzahl zwischen Zone 1 und Zone 4 war auch in der vier Wochen Gruppe

deutlich erkennbar, jedoch etwas schwächer ausgeprägt als in der zwei Wochen Gruppe. Der Maximalwert in Zone 1 lag nach vier Wochen bei 4,8 (M2) Zellen. In Zone 3 fanden sich zwischen 1 (M5) und 2,5 (M2) Zellen und in Zone 4 waren Werte mit einer Spanne von 0,2 (M5) bis 2,3 (M7) Zellen bestimmbar. Für alle untersuchten Biomaterialien waren somit in den verschiedenen Zonen Osteoklasten nachweisbar. Nach acht Wochen waren die Osteoklasten weitgehend gleich verteilt über alle Zonen. Der Maximalwert betrug 3,4 (M3, Z2) und der Minimalwert 1,5 (M6, Z1). Der multivariate Varianztest zeigte Unterschiede zwischen den einzelnen Zonen ($p=0,000$; Teststärke=1,0) und zwischen den verschiedenen Biomaterialien in den einzelnen Zonen zu den verschiedenen Zeitpunkten ($p=0,000$; Teststärke=1,0). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten waren nicht signifikant in durchgeführten Post Hoc Tests (Scheffe, Bonferroni).

4.5.3.2.4 Lymphozyten und Plasmazellen

Nach zwei Wochen war die Zahl der Lymphozyten und der Plasmazellen annähernd gleich für alle Biomaterialien in den vier Zonen. Die Zellzahlen lagen zwischen 3,2 (M6, Z2) und 13,7 (M2, Z1). Ausnahmen bildeten folgende Werte: Für das Material M3 wurden in der äußeren Zone (Z1) 72 Zellen gezählt. Für das Material M5 wurden in der Zone 2 29,5 und in Zone 3 18,5 Zellen gezählt. In der vier Wochen Gruppe lagen die Zellzahlen der Lymphozyten und Plasmazellen zwischen 0,5 (M2, Z3) und 25,2 (M6, Z1) in den verschiedenen Zonen. Nach acht Wochen lagen die Zellzahlen zwischen 0,7 (M1, Z1) und 19 (M7, Z3). Die höchsten Werte wurden dabei für die Materialien M6 und M7 in den Zonen 2 (M6: 13,4; M7: 14,4) und 3 (M6: 16,8; M7: 19) bestimmt. Der multivariate Varianztest zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zonen ($p>0,050$; Teststärke=0,196) und zwischen den verschiedenen Biomaterialien in den einzelnen Zonen zu den verschiedenen Zeitpunkten ($p>0,050$; Teststärke=0,916). In den Tests nach Scheffe und Bonferroni konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen werden.

4.6 Histomorphometrie

In der histomorphometrischen Untersuchung wurden die relativen Anteile der Komponenten neugebildeter Knochen, Implantat, und Weichteilgewebe am Bohrdefekt (100%) gemessen. Die Tabellen 14 bis 16 im Abschnitt 8.1.3 fassen die Ergebnisse zusammen.

4.6.1 Neugebildeter Knochen

4.6.1.1 Ebene A

In der zwei Wochen Gruppe zeigten die Biomaterialien M4 (5,4%) und M2 (5,1%) die höchsten Anteile neuen Knochens. Alle anderen Materialien zeigten Anteile im Bereich von 1 bis 1,6%. Nach vier Wochen konnte für M4 mit 18,4% der höchste Anteil gemessen werden, gefolgt von M2 (12,7%), M6 (12,4%) und M1 (12,1%). Den niedrigsten Wert erzielte Biomaterial M5 mit 7,3%. Das Biomaterial M4 hatte mit 59% nach acht Wochen den höchsten Anteil neuen Knochens. Es folgten die Materialien M3 (45,9%) und M1 (45,1%). Das niedrigste Ergebnis wurde für M2 (35,3%) gemessen.

Die Unterschiede zwischen den Biokeramiken in den untersuchten Zeitgruppen waren nicht signifikant. Zu allen Zeitpunkten konnte für Biomaterial M4 der höchste Anteil neugebildeten Knochens am Bohrloch nachgewiesen werden. Über die beobachteten Zeiträume hinweg war bei allen Materialien eine kontinuierliche Zunahme des Anteils der Knochensubstanz am Bohrloch zu verzeichnen.

4.6.1.2 Ebene B

Für die Materialien M2 (8,2%), M4 (7,9%) und M3 (6,9%) wurden nach zwei Wochen die höchsten Anteile neuen Knochens gemessen. Der niedrigste Wert wurde für das Biomaterial M7 (4,1%) bestimmt. In der vier Wochen Gruppe konnte der höchste Knochenzuwachs für Material M4 (33,2%) beobachtet werden. Die niedrigsten Werte in dieser Gruppe zeigten die Biokeramiken M7 und M8 mit 14% und 19%. Für die anderen Biomaterialien wurden Werte im Bereich von 20,2 bis 21,8% bestimmt. Den höchsten Anteil neugebildeten Knochens in der acht Wochen Gruppe hatte das Implantat M4 (47,1%), gefolgt von den Implantaten M1, M2 und M3. Deren Ergebnisse lagen im Bereich von 43,3 bis 45,1%. Den niedrigsten Knochenanteil am Bohrloch zeigte das Granulat (M8). In allen Zeitgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Anteile des neugebildeten Knochens stiegen für alle Materialien über die beobachteten Zeiträume von zwei bis acht Wochen kontinuierlich an. Im Verlauf der Beobachtungszeiträume zeigte die Biokeramik M4 den höchsten Knochenzuwachs. Insgesamt waren nach zwei und vier Wochen die Knochengewebsanteile am Bohrloch in Ebene B höher als in Ebene A.

4.6.2 Implantat

4.6.2.1 Ebene A

Die höchsten Anteile des implantierten Materials konnten in der zwei Wochen Gruppe für die Materialien M7 (61,1%) und M5 (42,8%) bestimmt werden. Den niedrigsten Anteil hatte das Implantat am Bohrloch für das Material M8 mit 20,7%. Die Ergebnisse der anderen implantierten Materialien lagen in einem mittleren Bereich (37,4% bis 28,3%, $M6 > M1 > M3 > M2 > M4$). Der für M7 gemessene Wert unterschied sich signifikant von den, für die Biomaterialien M1, M2, M3, M4 und M8, bestimmten Ergebnissen. Besonders stark war die Signifikanz gegenüber M8 ($p = 0,000$). Auch nach vier Wochen konnten die höchsten Implantatgehalte für die Materialien M7 (48,7%) und M5 (28%) bestimmt werden. In absteigender Reihenfolge wurden für folgende Materialien die nächsthöheren Implantatgehalte am Bohrloch nachgewiesen: $M3 > M8 > M6 > M4$. Die niedrigsten prozentualen Anteile des Implantats am Bohrloch konnten für die Materialien M2 (5,9%) und M1 (7,6%) gemessen werden. Das Ergebnis des Biomaterials M7 war gegenüber den für alle anderen Materialien gemessenen Werten signifikant. Dabei war der p-Wert für die Materialien M1 bis M4 sowie für M6 und M8 kleiner gleich 0,001. Signifikante Unterschiede gab es weiterhin zwischen dem für M5 gemessenen Wert und den für die Materialien M1, M2 und M4 bestimmten Werten (Tab. 15, Abschnitt 8.1.3). Für die nach einem Zeitraum von acht Wochen gewonnenen Proben konnten folgende Werte bestimmt werden: Die höchsten Implantatanteile wurden erneut für M7 (22,9%) und M5 (8,9%) gemessen und die niedrigsten Implantatgehalte wurden für M2 (1,9%) und M8 (2,6%) bestimmt. Die Ergebnisse der anderen Implantate lagen in der Reihenfolge $M3 > M6 > M4 > M1$ in einem mittleren Bereich zwischen 4% und 6,3%. Das für M7 ermittelte Ergebnis unterschied sich signifikant von den für die anderen Biomaterialien ermittelten Ergebnissen. Besonders stark war die Signifikanz gegenüber den Ergebnissen für M8 ($p = 0,000$) und M1 ($p = 0,001$).

4.6.2.2 Ebene B

Nach einem Untersuchungszeitraum von zwei Wochen konnte der höchste Implantatgehalt für die Materialien M7 (55,6%) und M5 (42,3%) bestimmt werden. Der niedrigste Wert konnte für das Biomaterial M8 (24,6%) gemessen werden. Für die übrigen untersuchten Materialien konnten Werte zwischen 34,1% und 29,9%

(M6>M1>M4>M2>M3) bestimmt werden. Der Wert für die Keramik M7 war signifikant höher als die für M3 ($p=0,032$) und M8 ($p=0,004$) ermittelten Ergebnisse. Nach vierwöchiger Implantationszeit der Biokeramiken konnten die höchsten prozentualen Implantatgehalte für die Materialien M7 (49%) und M5 (33,8%) gemessen werden. Diese Ergebnisse unterschieden sich jeweils signifikant von den Ergebnissen der anderen untersuchten Materialien (Tab 15, Abschnitt 8.1.3). Dabei sind die Signifikanzen des Ergebnisses von M7 gegenüber M1 bis M4, M6 und M8 und des Ergebnisses von M5 gegenüber M1, M2 und M4 am stärksten ($p\leq 0,001$). Die niedrigsten Implantatgehalte in der vier Wochen Gruppe konnten für die Materialien M1 (9%) und M2 (12,9%) nachgewiesen werden. Für die anderen Materialien konnte ein Anteil an der Bohrlochfläche zwischen 20,3% und 14,8% bestimmt werden (M6>M3>M8>M4). In der acht Wochen Gruppe ergaben sich folgende Ergebnisse: Auch hier hatten die Keramiken M7 (21,9%) und M5 (16,9%) die höchsten prozentualen Anteile an der Bohrlochfläche. Die niedrigsten Werte ergaben sich für die Stoffe M2, M1 und M8 (2,5- 3,4%). Die anderen Biomaterialien lagen in einem mittleren Bereich in der Reihenfolge M6>M3>M4. Ein signifikanter Unterschied bestand in dieser Zeitgruppe zwischen den Ergebnissen der Materialien M7 und M2. Über die beobachteten Zeiträume war für jede Biokeramik ein konstanter Substanzverlust zu beobachten. Dieser war bei den Materialien M7 und M5 am wenigsten ausgeprägt. Insgesamt am größten waren die Substanzverluste des Implantats über den untersuchten Zeitraum hinweg für die Materialien M1, M2 und M8.

4.6.3 Weichteilgewebe

4.6.3.1 Ebene A

Nach zwei Wochen konnte der höchste Gehalt des Weichteilgewebes für die Proben der Biokeramik M8 (78%) gemessen werden. Der niedrigste Gehalt wurde bestimmt für Material M7 mit 37,6%. Dieser Wert war signifikant kleiner als die Werte, die für die Materialien M3, M4 und M8 bestimmt wurden, wobei der Unterschied zu M8 am stärksten ausgeprägt war (Tab. 15, Abschnitt 8.1.3). Die anderen untersuchten Materialien wiesen Anteile des Weichteilgewebes zwischen 55,6% und 66,3% auf. Die höchsten prozentualen Anteile in der vier Wochen Gruppe wurden für die Biokeramiken M2 (81,4%) und M1 (80,3%) bestimmt, der niedrigste für das Material M7 (40,7%). Die Ergebnisse der anderen untersuchten Stoffe befanden sich in dem

Bereich zwischen 71,4% und 64,6%. Signifikanzen ergaben sich zwischen dem für M7 gemessenen Wert und den für die Biomaterialien M1, M2, M4, M6 und M8 gemessenen Werten ($p=0,002-0,044$). Nach acht Wochen wurde für das Material M2 (63,3%) der höchste Anteil des Weichteilgewebes am Bohrloch bestimmt. Die niedrigsten Werte wurden für die Biomaterialien M4 (36,1%) und M7 (36,6%) ermittelt. Die für die anderen Biokeramiken bestimmten Werte lagen zwischen 47,8% und 59,1%. Es konnten in dieser Zeitgruppe keine Signifikanzen nachgewiesen werden. Insgesamt war tendenziell eine Abnahme des Anteils des Weichteilgewebes zwischen den Zeiträumen von zwei und acht Wochen zu verzeichnen. Für alle Materialien, außer für das Material M8 konnte zwischen den Zeiträumen von zwei und vier Wochen ein Anstieg des Weichteilanteils verzeichnet werden.

4.6.3.2 Ebene B

Auch in der Ebene B wurde nach zwei Wochen der höchste Anteil des Weichteilgewebes am Bohrloch für das Material M8 (70,4%) gemessen und der niedrigste Anteil für das Material M7 (40,3%) bestimmt. Für alle übrigen Biomaterialien wurden Werte im Bereich zwischen 53,5% und 63,2% gemessen. Das für M7 ermittelte Ergebnis unterschied sich signifikant von dem für M8 ermittelten Ergebnis ($p=0,006$). Nach vier Wochen zeigten die Materialien M1 (69,2%) und M2 (66,9%) die höchsten Werte in Ebene B, wie auch in Ebene A. Die nächsthöheren Werte wurden für die Biokeramiken M8 (65,2%) und M3 (61,9%) bestimmt. Den niedrigsten Anteil des Weichteilgewebes hatte in dieser Gruppe Material M7 (37%). Dies entspricht ebenfalls dem Ergebnis aus der Ebene A. Für die anderen Biomaterialien wurden mittlere Werte zwischen 44,1% und 59,2% gemessen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen dem Ergebnis von M7 und M1, M2, M3, M6 und M8 und zwischen dem Ergebnis für M5 und M1 bzw. M2. Der Unterschied zwischen M7 und M1 war stark ausgeprägt ($p=0,001$). In der acht Wochen Gruppe betrug der höchste Wert für das Biomaterial M8 62,7%. Der niedrigste Wert lag bei 41,6% und wurde für die Keramik M7 gemessen. Die Ergebnisse der anderen Materialien lagen im Bereich zwischen 45,4% und 52,4%. In dieser Zeitgruppe gab es keine Signifikanzen (Tab 15, Abschnitt 8.1.3). Insgesamt nahm der Anteil des Weichteilgewebes im Zeitraum von zwei bis acht Wochen ab. Dies galt jedoch nicht für das Material M7.

4.6.3.3 Korrelationen der Komponenten Neugebildeter Knochen, Implantat und Weichteilgewebe in Ebene B

Der Anteil des neugebildeten Knochens war negativ korreliert mit den Anteilen von Implantat und Weichteilgewebe am Bohrlochquerschnitt. Negativ korrelierten auch die Komponenten Implantat und Weichteilgewebe (Tab 16, Abschnitt 8.1.3).

4.7 Röntgendiffraktometrie der DCP Proben

Die Untersuchung ergab dass, sich die chemische Zusammensetzung (Monetit) der untersuchten Proben aus der zwei, vier und acht Wochen Gruppe in vivo nicht verändert hatte. In den Proben der vier und der acht Wochen Gruppe konnten zusätzlich Spuren von Hydroxylapatit gefunden werden (Abschnitt 8.3.2).

5 Diskussion

5.1 Tiermodell und Versuchsaufbau

Ein Tiermodell wird an der Übertragbarkeit seiner Resultate auf den Menschen gemessen⁷³. Während Nagetiere für Vorstudien geeignete Versuchstiere sind⁸³, sollten Medizinprodukte vor ihrer Anwendung in klinischen Studien auch in einer Großtierstudie bezüglich ihrer Tauglichkeit für die Anwendung am Menschen überprüft werden^{68,73}. Die Skelettstrukturen der hierfür in Frage kommenden Spezies ähneln in ihrer Größe den humanen Knochen und ermöglichen so die Entwicklung chirurgischer Techniken unter Nutzung humaner Instrumentarien⁸³. Auch die mechanische Beanspruchung eines Implantats im Großtiermodell entspricht eher den Bedingungen, denen es im Menschen ausgesetzt wäre⁶⁸. Die Untersuchung der Zusammensetzung, Dichte und Qualität des Knochens bei sieben Wirbeltierspezies ergab, dass, abgesehen von Primaten⁸³, der Knochen des Hundes die größte Ähnlichkeit zu dem des Menschen aufweist. Eine mittlere Vergleichbarkeit ergab sich für das Schaf⁶⁹. Relevante Unterschiede bezüglich der mineralischen Zusammensetzung des Knochens zwischen dem Menschen und den Spezies Schaf, Rind und Hund fanden Ravaglioli *et al.* jedoch nur in der frühen Wachstumsperiode⁸⁴. Aufgrund ethischer und emotionaler Einflüsse wird allerdings in der Europäischen Union auf den Einsatz von Primaten und Hunden zu Tierversuchszwecken wenn möglich verzichtet^{67,83}. So hat sich das Schaf als Modelltier in der orthopädischen Forschung etabliert⁶⁷. Die in Schafmodellen gewonnenen Ergebnisse sind erfahrungsgemäß gut vergleichbar mit den Resultaten humaner Untersuchungen⁸⁵. Das Körpergewicht eines Schafs entspricht annähernd dem des Menschen⁸³ und auch die Knochenheilungsrate des Schafs kommt der des Menschen nahe⁸⁶. Zur Untersuchung acht verschiedener Biomaterialien wurde in dieser Studie das Drillhole Modell gewählt. Es handelt sich dabei um ein standardisiertes Tiermodell welches gut geeignet ist um das Verhalten verschiedener Biomaterialien *in vivo* zu evaluieren^{1,87-92}. Bei der Planung eines Tierversuchs ist es wichtig die Tierzahlen so gering wie möglich zu halten⁸³. Da wir jedem Tier acht verschiedene Biomaterialien implantieren konnten, gelang es uns ihre Anzahl auf ein Minimum von sechs Schafen pro Zeitgruppe reduzieren. Weiterhin ermöglichte die Art der Probenverteilung in diesem Versuch den Ausgleich intra- und interindividueller Differenzen und erhöhte somit die Aussagekraft der Ergebnisse.

5.2 Biomaterialien und Implantatvorbereitung

Sieben der in dieser Studie verwendeten Biomaterialien (M1-M7) kamen als poröse Blöcke zum Einsatz. Eine perfekte Anpassung solcher Implantate an Defektstrukturen ist schwierig, was die Kontaktfläche zwischen Implantat und umliegendem Knochen beeinträchtigen kann⁴³. Die in diesem Versuch verwendeten Biomaterialien wurden jedoch entsprechend der Größe des Defektes synthetisiert, wodurch eine Anpassung an die Defektgröße gewährleistet war. Hinweise auf verzögerte Defektheilung aufgrund verminderter Kontaktflächen konnten somit in der histologischen Untersuchung nicht gefunden werden. In der klinischen Anwendung sollte diese Problematik jedoch bei der Wahl des Implantats in Betracht gezogen werden. Poröse Materialien sind zwar weniger widerstandsfähig gegen mechanische Belastung, der schnelle Ersatz dieser Materialien durch Knochen fördert die Defektstabilität jedoch am wirkungsvollsten⁴³. Und da poröse Blöcke und Granulate häufig in Kombination mit stabilisierenden Metallimplantaten eingesetzt werden, ist es sinnvoll den Schwerpunkt der Materialentwicklung auf Verbesserung von Implantatresorption und Knochenheilungsrate zu legen³. Bei der Anwendung von β -TCP konnten in humanmedizinischen Studien diesbezüglich auch im Vergleich zu autologen Knochentransplantaten bereits sehr gute klinische Ergebnisse erzielt werden¹⁹. Es ist bekannt, dass sehr schnell resorbierbare Keramiken in vivo zu carboniertem Hydroxylapatit umgewandelt werden können^{27,44}, was zu einer unerwünschten Verlangsamung der Resorption führt. Die Möglichkeit einer solchen Umwandlung bestand grundsätzlich auch für das in dieser Studie verwendete Biomaterial M7. Röntgendiffraktrometrisch wurde eine Umwandlung des Monetits allerdings ausgeschlossen. Durch gründliche Probenvorbereitung, Charakterisierung und Kennzeichnung der Proben konnten wir Verwechslungen vermeiden und eine hohe Aussagekraft der Ergebnisse gewährleisten.

5.3 Operation und Postoperative Phase

Die Operationen wurden durch erfahrene Chirurgen durchgeführt und verliefen ohne relevante Komplikationen. Als schwierig stellte sich die Implantation der Biomaterialien mit hoher Mikroporosität (M1, M2) heraus. Stets wurden sie unter größter Vorsicht implantiert. Dabei konnte trotzdem nicht ausgeschlossen werden, ob es zu Stauchungen oder Frakturen der Implantatstruktur durch die Manipulation gekommen war, denn die Beurteilung der Implantatintegrität post implantationem war

nicht möglich. Auch die postoperative Phase verlief zufriedenstellend und die Tiere erholten sich gut von den Operationen.

5.4 Probenverarbeitung und Auswertung

Auf eine Auswertung der post mortem angefertigten Röntgenbilder, der Mikroradiografien der histologischen Schnitte und der Fluoreszenzschnitte wurde in dieser Arbeit verzichtet, da kein weiterer Erkenntnisgewinn zu erwarten war. Für die durch das Sägen der Knochenquader beschädigten Proben ergab sich keine Einschränkung der Auswertbarkeit. Eine qualitative Untersuchung der Dünnschnitte war für das Biomaterial M7 nicht möglich und damit musste die semiquantitative Untersuchung dieses Materials anhand der Dickschnitte durchgeführt werden. Eine detaillierte Beurteilung der Weichteilgewebsstrukturen war deswegen nicht möglich. Während sich die Ergebnisse für die Anteile des Implantats in der semiquantitativen Untersuchung in einer realistischen Dimension befanden, überstiegen die Resultate der Histomorphometrie die realen Werte. Diese Erwartungswerte ergaben sich aus der Materialcharakterisierung (Tab.1-3, Abb.1; Abschnitt 3.1). Die Abweichungen wurden vor allem in der zwei Wochen Gruppe deutlich. In der histomorphometrischen Untersuchung wurden die Flächenanteile zwar durch ein Computerprogramm gemessen, die Markierung der einzelnen Komponenten in den digitalisierten Toluidinblauschnitten gestaltete sich aber schwierig. In den zwei und vier Wochen Gruppen erschwerte die nahezu identische Färbung der Komponenten Knochen und Implantat deren Markierung. Damit mussten zur Unterscheidung der einzelnen Anteile auch strukturelle Unterschiede herangezogen werden. Problematisch war zudem, dass in den untersuchten Dickschnitten im Vergleich zu den Dünnschnitten eine höhere Schichtdicke angefärbt war. Die Anteile des Implantats erhöhten sich damit. Außerdem waren die Mikrostrukturen als Folge der Präparationsmethode und der gewählten Vergrößerung nicht sichtbar. Da die Mikroporen in der Toluidinblaufärbung nicht distinguert werden konnten, mussten sie als Knochen angefärbt werden. In der Histomorphometrie war dieser Fehler über alle Gruppen konstant, nahm aber mit fortschreitendem Knochenwachstum und Implantatresorption ab. Insgesamt ergab sich jedoch, dass die semiquantitative Untersuchung für die Proben der zwei Wochen Gruppe die sensiblere und damit aussagefähigere Methode darstellte. In den Dünnschnitten waren die einzelnen Komponenten zwar eindeutig zu unterscheiden, aus

technischen Gründen war es allerdings nicht möglich sie histomorphometrisch zu untersuchen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Implantationslokalisationen wurden nicht untersucht, denn in früheren Untersuchungen mit über 70 Schafen und mindestens 560 Implantaten an diesen Lokalisationen ergaben sich dabei keine Unterschiede (unveröffentlichte Daten).

5.5 Ergebnisse

Die in dieser Studie untersuchten Biomaterialien M1 bis M8 waren biokompatibel, resorbierbar, osteokonduktiv und führten zu angemessenen Knochenneubildungsraten in den Defektlokalisationen. Die Resorptionszeiten und die Knochenbildungsraten der acht untersuchten synthetischen Knochenersatzmaterialien variierten aufgrund unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung und Struktur. Tendenziell wurde die beste knochenbildende Wirkung durch Implantation der Biokeramiken M3 (geringe Mikroporosität und kleine Korngröße) und M4 (geringe Mikroporosität und große Korngröße) in die standardisierten Defekte erzielt.

5.5.1 Qualität der Knochenneubildung

Es wurde deutlich, dass eine strukturierte, poröse, Makroarchitektur eines schnell resorbierbaren Implantats die wichtigste Grundlage für die Bildung neuen Knochens in einem Defekt bildet. War die Struktur der implantierten Materialien erhalten, bildete sich Granulationsgewebe in deren Makroporen (Abb. 42, Abschnitt 8.2). Dieses war entsprechend der Porenform knotig organisiert und an der Grenze zwischen Granulationsgewebsstrukturen und Implantatoberfläche konnten schließlich Osteoblasten nachgewiesen werden (Abb. 46, Abschnitt 8.2). Multizentral konnte das durch diese Zellen synthetisierte Osteoid in Form zunächst zarter Osteoidsichel auf der Implantatoberfläche nachgewiesen werden (Abb. 44, Abschnitt 8.2). Mit zunehmender Osteoidapposition und Mineralisation verschmolzen diese Strukturen zu Knochenbälkchen. Da das Implantat die Grundlage für die Anlagerung von Knochen bildete, wurden auch Teile des Implantatgerüsts in die neu entstehende Knochenstruktur integriert (Abb. 45, Abschnitt 8.2). Da die Struktur der verschiedenen Materialien, abhängig von ihren Resorptionsraten, mehr oder weniger erhalten blieb, war auch das Ausmaß der multizentralen Knochenbildung dementsprechend mehr oder weniger ausgeprägt. Stets erfolgte zusätzlich ein vom Defektrand ausgehendes ringförmiges Knochenwachstum. Mit zunehmender Reife der Knochenstrukturen

änderte sich die Zusammensetzung des Weichteilgewebes und Granulationsgewebe wandelte sich zu Fettgewebe. Insgesamt zeigten die Materialien M1 bis M4 ein sehr schnelles multizentrales Wachstum neuen Knochens. Aufgrund der hohen Resorptionsraten waren die Implantatstrukturen der Materialien M1 und M2 schon nach zwei Wochen in den Randbereichen des Defektquerschnitts teilweise aufgelöst. Solche Bereiche waren mit unstrukturiertem Granulationsgewebe gefüllt. Diese frühe Strukturauflösung der Implantate war wahrscheinlich auch die Ursache für ein nach acht Wochen zwar gutes, aber im Vergleich zu M3 und M4 inhomogeneres, tendenziell schlechteres Ergebnis. Die Biomaterialien M4 und vor allem M3 induzierten die höchsten Knochenneubildungsraten und nach acht Wochen waren die Implantate größtenteils resorbiert und durch eine recht regelmäßige, dichte Trabekelstruktur ersetzt. In der qualitativen Untersuchung der die Keramik M5 enthaltenden Proben ergab sich der Eindruck einer vergleichsweise verzögerten Reaktion. Nach acht Wochen ergab sich ein homogenes Bild multizentraler Knochenbildung. Im Verhältnis zu den anderen untersuchten Biomaterialien war hier ein früheres Stadium der Umbauprozesse im Defektbereich sichtbar. Die Keramik M6 war bei recht schneller Resorptionsrate teilweise aufgelöst noch bevor sich Knochen auf ihrer Grundlage bilden konnte. Dadurch ergab sich ein vergleichsweise unregelmäßigeres, schlechteres Bild der Knochenneubildung. Bei der Beurteilung des Implantats M8 fiel schon nach zwei Wochen eine uneinheitliche, teilweise inselförmige Verteilung der Implantatstrukturen auf. Nach acht Wochen waren die Knochenstrukturen in den mit dem Granulat gefüllten Defekten am unregelmäßigsten verteilt und auch die Qualität des neugebildeten Knochens war an uneinheitlichsten unter den untersuchten Biomaterialien.

Da sich Knochen auf die Calciumphosphatimplantate auflagert und diese damit einschließen kann, wird die Zugänglichkeit des Materials für die zelluläre Resorption vermindert und die Resorptionsrate sinkt⁸⁵. Verzögert sich die Resorption dieser Implantatreste, bleiben sie lange im Knochen erhalten und können dessen mechanische Belastbarkeit beeinträchtigen²⁶. Die Ergebnisse dieser Studie ermöglichten es jedoch nicht eine Aussage über die mechanische Belastbarkeit der neu entstandenen Knochenstrukturen zu treffen.

5.5.2 Implantatresorption und Knochenbildungsraten

Zwar war nach zwei Wochen die semiquantitative Untersuchung sensibler als die Histomorphometrie, am aussagekräftigsten war jedoch die ergänzende Betrachtung

beider Methoden. Die Unterschiede zwischen den Flächenanteilen waren zum Teil sehr fein und schwer zu bestimmen. Somit waren signifikante Unterschiede zwischen den Knochenanteilen bei teilweise großen Standardabweichungen nicht feststellbar. Es zeigten sich allerdings deutliche Tendenzen bezüglich des Verhaltens der verschiedenen Biokeramiken in vivo. Die höchsten Knochenzuwachsrate wurden stets durch eines der Materialien 1-4 erzielt und, zusammenfassend, erzielten die Materialien M3 und M4 die besten Knochenbildungsrate (Tab. 5 u. 8, Abschnitt 8.1.1; Tab. 14, Abschnitt 8.1.3). Für alle Materialien war über den untersuchten Zeitraum hinweg ein guter, kontinuierlicher Knochenzuwachs zu verzeichnen. Nur für das Material M5 stagnierte das Knochenwachstum zwischen zwei und vier Wochen. In Ebene B lagen die Knochenbildungsrate der Materialien M5-M8 deutlich unter denen der Materialien M1-M4. Tendenziell wurden die niedrigsten Knochenbildungsrate am häufigsten für die Materialien M5, M7 und M8 beobachtet. Weniger günstige Bedingungen für die Knochenheilung im an die Knochenoberfläche angrenzenden Bereich des Implantats und ein schnelles Einwachsen des Weichteilgewebes von lateral führten zu schlechteren Resultaten in Ebene A. Allgemein wurde deutlich, dass das Knochenwachstum von außen nach innen (Zone 1 bis Zone 3) fortschritt^{49,93}. Allerdings verfügten die Biomaterialien mit den höchsten Knochenzuwachsrate schon früh über zusätzliche diffuse Knochenbildungszentren in den zentralen Bereichen des Defektes, was auf eine gute Osteokonduktion der Materialien hinweist. Die niedrigste Resorptionsgeschwindigkeit war konstant und signifikant für das Material M7 nachweisbar, häufig gefolgt vom Biomaterial M5. Die höchsten Resorptionsrate dagegen konnten für M1, M2 und M8 beschrieben werden. Folgende Reihenfolge ließ sich für die Biomaterialien M1 bis M4 erarbeiten: $M1 > M2 > M4 > M3$. Eine mittlere Resorptionsrate wurde für das Biomaterial M6 ermittelt. Die Implantatresorption schritt von außen nach innen fort und die Implantatsubstanz nahm kontinuierlich bis zum Zeitpunkt von acht Wochen ab. Die einzige Ausnahme von dieser Regel bildete M8, denn dessen Resorption verlief besonders in der Anfangsphase unregelmäßig. Zusätzlich konnte für dieses Biomaterial nach acht Wochen der höchsten Weichteilgehalt bestimmt werden. Der Anteil des Weichteilgewebes ergab sich allgemein als Folge des Zusammenspiels von Knochenbildungs- und Resorptionsrate der Implantate. Im Zentrum des Defekts war der Weichteilgehalt dabei grundsätzlich etwas höher als in dessen Randbereichen. Mit zunehmender Knochenreife wurde

Granulationsgewebe durch Fettgewebe ersetzt, welches schließlich die reifen Knochenstrukturen umgab. Der Anteil des Granulationsgewebes war damit ein Maß für die Geschwindigkeit der Knochenheilung. Nach einem Zeitraum von acht Wochen konnte der höchste Granulationsgewebsanteil für M5 und die niedrigsten Anteile für M3 und M4 beschrieben werden. Verließ der Heilungsprozess schnell, war der Bohrdefekt nach acht Wochen mit von Fettgewebe umgebenen Knochentrabekeln umgeben. Der Fettgewebsanteil entsprach bis zu 50,8%, ein physiologisches Maß⁹⁴. Insgesamt war nachweisbar, dass vermehrte Implantatresorption zu erhöhtem Knochenwachstum führte (negative Korrelation: Tab. 7 u. 16, Abschnitt 8.1). Dass für alle Biomaterialien auch nach acht Wochen geringe Anteile des Granulationsgewebes im Bohrlochquerschnitt nachweisbar waren, zeigte, dass die Umbauprozesse im Bohrdefekt nach acht Wochen noch nicht abgeschlossen waren.

5.5.3 Zellgehalt und -verteilung

Die mit der Implantation eines Biomaterials einhergehende Gewebeverletzung initialisiert zunächst eine physiologische akute Entzündungsreaktion, gekennzeichnet unter anderem durch das vermehrte Auftreten lymphoplasmazellulärer und neutrophiler Zellen^{46,95,96}. Eine sich anschließende Fremdkörperreaktion mit Granulationsgewebsbildung und der Präsenz von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen ist Teil des normalen Wundheilungsprozesses nach der Implantation von Biomaterialien^{95,97}. Auf diese Weise werden Mechanismen, die schließlich zu Heilung und Regeneration führen, in Gang gesetzt⁹⁵. Generell werden in der Umgebung poröser Materialien mit großer Oberfläche vergleichsweise mehr Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen beobachtet, als in der Umgebung von Materialien mit glatter Oberfläche⁹⁵. Unter diesem Aspekt waren die Zellzahlen, welche in der Umgebung der verschiedenen Biomaterialien bestimmt wurden, angemessen und befanden sich im physiologischen Bereich. Somit bestätigten die Untersuchungen zu Zellgehalt und -verteilung die gute Biokompatibilität der untersuchten Keramiken. Bei hoher Fremdmaterialbelastung fusionieren Makrophagen, unter dem Einfluss von durch Lymphozyten freigesetzten Interleukinen, zu Fremdkörperriesenzellen^{95,98}. Daher konnten Fremdkörperriesenzellen tendenziell in Bereichen hoher Makrophagenaktivität nachgewiesen werden und das Auftreten dieser beiden Zelltypen war positiv miteinander korreliert ($p=0,025$). Während für Materialien mit kleinerer Korngröße die höchsten Fremdkörperriesenzellzahlen nach zwei Wochen gefunden wurden, war ihre Anzahl für Materialien

mit größerer Korngröße nach vier Wochen am höchsten. Mit dem Ende der Abbauprozesse waren nach acht Wochen kaum noch Zellen dieses Typs vorhanden. Eine Ausnahme bildete nur Material M6 in Zone 3, ein Zeichen nicht abgeschlossener Resorptionsprozesse. Die Makrophagenzahl war stets in den Zonen mit den aktivsten Umbauprozessen am höchsten. Hinweise auf einen überstürzten Abbau der Implantate durch Makrophagen, gekennzeichnet durch hohe Zellzahl und breite Resorptionszonen, waren nicht vorhanden. Das Vorkommen von Osteoklasten war assoziiert mit den laufenden Umbauprozessen im Knochen⁹⁴. So war dieser Zelltyp in konstant niedrigen Zahlen in den Bereichen mit reiferen Knochenstrukturen nachweisbar. Sein Vorkommen korrelierte negativ mit dem der für Entzündung und Fremdkörperreaktion charakteristischen Zelltypen. Bis zum Zeitpunkt von acht Wochen stieg die Zahl der Osteoklasten an. Hier zeigte sich dann eine nahezu ausgeglichene Verteilung der Zellen dieses Typs über die einzelnen Zonen hinweg. Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Zellgehalt und -verteilung waren in den einzelnen untersuchten Gruppen ähnlich ($p>0,05$) und die Teststärken multivariaten Varianzanalysen deuteten auf eine hohe Reproduzierbarkeit der in den Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse hin.

5.5.4 Zusammenhang zwischen Materialeigenschaften und in vivo Verhalten der untersuchten Biokeramiken

Die untersuchten β -TCP und DCP Implantate wurden innerhalb der beobachteten acht Wochen fast vollständig resorbiert und abhängig von ihrer Resorptionsrate in unterschiedlichem Maße durch Knochengewebe substituiert.

Die Synthese der Implantate M1 bis M4 erfolgte systematisch, um zu untersuchen welchen Einfluss Mikroporosität und Korngröße auf die Resorptionsrate von Biomaterialien haben. Insgesamt führte die Implantation dieser vier Keramiken zu einem sehr guten Voranschreiten der Knochenheilung. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Mikroporosität zu einer deutlich beschleunigten Implantatresorption führt. Unterschieden sich zwei Materialien nur bezüglich des Anteils der Mikroporen, so war das Material mit der höheren Mikroporosität schneller resorbierbar ($M1>M3$, $M2>M4$). Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Der Einfluss der Mikroporosität auf die Resorptionsrate war in dieser Studie besser nachweisbar als der Einfluss der Korngröße eines Biomaterials, denn die Unterschiede im Resorptionsverhalten zwischen den Materialien M1 und M2 sowie M3 und M4 waren zwar vorhanden, aber geringer ausgeprägt. Für Biomaterialien

mit höherer Mikroporosität und kleinerer Korngröße vergrößerte sich im Laufe des Resorptionsprozesses die spezifische Oberfläche des Implantats, die daraus resultierende Erhöhung der Kontaktfläche zum Körpergewebe führte zu einem auf das Volumen bezogen höherem Materialumsatz. Die Ausgangswerte für die spezifische Oberfläche der Materialien unterschieden sich kaum und waren nicht die Ursache für die Unterschiede im Resorptionsverhalten der Biomaterialien M1 bis M4. Die chemische Löslichkeit müsste sich aufgrund der Materialcharakteristika wie folgt verhalten: $M1 > M2, M3 > M4$. Für die Materialien M2 (hohe Mikroporosität und große Korngröße) und M3 (geringe Mikroporosität und kleine Korngröße) war kein Unterschied zu erwarten. Im biologischen System war diese Reihenfolge nicht deutlich reproduzierbar und geringe Unterschiede im Löslichkeitsverhalten wie zwischen Material M1 und M2 waren in vivo kaum nachweisbar. Somit ist anzunehmen, dass Unterschiede im Löslichkeitsverhalten einzelner sehr schnell resorbierbarer Materialien in biologischen Systemen gepuffert werden können. Dass keine deutlichen Unterschiede bezüglich den Resorptionsraten zwischen M3 und M4 festzustellen waren, könnte auf den höheren Anteil von α -TCP am Material M4 (16%) zurückzuführen sein. α -TCP hat unter physiologischen Bedingungen eine höhere Löslichkeit als β -TCP²⁴. Daher wäre es sinnvoll die Ergebnisse dieser Studie Untersuchungen zum Löslichkeitsverhalten der Keramiken in vitro gegenüber zu stellen. So könnte geklärt werden, welche der beobachteten Phänomene durch Materialstruktur und -zusammensetzung ausgelöst wurden und welche biologisch begründet waren. Die sehr schnell resorbierbaren Biokeramiken M1 und M2 waren intra operationem aufgrund ihrer hohen Mikroporosität sehr brüchig und damit schwer zu handhaben. Da ihr Einsatz keinen Vorteil für die Knochenheilung gegenüber den etwas langsamer resorbierbaren Materialien M3 und M4 brachte, sollte von ihrer klinischen Verwendung zugunsten der besser handhabbaren Materialien M3 und M4 verzichtet werden. Diese Materialien wären vermutlich sehr gut für klinische Anwendungen geeignet.

Das Referenzmaterial cyclOS (M5) induzierte gute, sehr konstante Knochenheilungsraten. Die Knochenbildungsrate war aber denen der Materialien M1 bis M4 unterlegen. Die Frage wieso das Material M5, bei mit dem Material M3 vergleichbaren Eigenschaften, eine langsamere Resorptionsrate aufwies, konnte in dieser Studie nicht beantwortet werden. Auch das Biomaterial turbOS (M6) zeigte sich als gutes Knochenersatzmaterial. Bezüglich der Knochenbildungsrate und bezüglich der

Konstanz der Ergebnisse schnitt es jedoch im Vergleich mit M3 und M4 bzw. cyclOS schlechter ab. Die Monetitimplantate (M7) schienen in diesem Versuch weniger gut geeignet zur Beschleunigung des Knochenwachstums. Denn die Resorptionsgeschwindigkeit dieser Implantate war aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften (geringere Makroporosität) deutlich langsamer als die der anderen untersuchten Materialien. Grundsätzlich wäre DCP zwar schneller resorbierbar als β -TCP, der Abbau der Probe M7 erfolgte jedoch aufgrund der architektonischen Eigenschaften, großer Korngröße mit vergleichsweise geringer Makro- und Gesamtporosität, deutlich langsamer als bei den anderen untersuchten Knochenersatzmaterialien. Ein direkter Vergleich der Resorptionsgeschwindigkeiten zwischen β -TCP und DCP war damit nicht möglich. Ein Beweis für den positiven Einfluss der porösen inneren Architektur einer Biokeramik auf die Resorptionsgeschwindigkeit wurde jedoch erbracht. Bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse der porösen Blöcke zeigte sich, dass hohe spezifische Oberfläche des Ausgangsmaterials allein kein entscheidendes prognostisches Kriterium für die Geschwindigkeit der Implantatresorption war: Die Biomaterialien M6 ($2\text{m}^2/\text{g}$) und M7 ($6\text{m}^2/\text{g}$) hatten deutlich größere spezifische Oberflächen als M1-M5 ($0,4\text{--}0,8\text{m}^2/\text{g}$), aber keine höheren Resorptionsraten. Für das Granulat wurden gute Ergebnisse erzielt, welche jedoch im Verhältnis zu anderen Materialien schlechter ausfielen. Im Vergleich der cyclOS Blöcke (M5) mit den cyclOS Granulaten (M8) zeigte sich, dass poröse Blöcke die besser geeignete Applikationsform synthetischer Knochenersatzmaterialien darstellten. Das Granulat bot grundsätzlich einen guten Reiz für die Knochenneubildung, die Kombination der Faktoren Partikelmigration¹⁹ und durch Granulierung erhöhte Resorptionsgeschwindigkeit führten zu schlechteren, inkonsistenteren Resultaten bei der Knochenneubildung. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Implantation schnell resorbierbarer β -TCP Materialien das Knochenwachstum beschleunigt wird. Ursache dafür ist sicherlich die durch die intensive Implantatlösung bedingte Erhöhung der Calcium- und Phosphatkonzentrationen im Gewebe^{39,40}. Die beste Knochenneubildungsrate ergab sich für die Biomaterialien M3 und M4 aus einem Kompromiss zwischen möglichst hoher Resorptionsrate und einer, so lang wie für die Knochenheilung erforderlich, erhaltenen Implantatstruktur. Werden Heilungsprozesse durch verzögerte Wundheilung und Ablauf lokaler Entzündungsprozesse verlangsamt und die Implantatresorption beschleunigt,

kann der Erfolg eines schnell resorbierbaren Materials beeinträchtigt werden. Dies erklärt auch, wieso die Resorption von β -TCP teilweise als schwer vorhersehbar und gelegentlich schneller als die Bildung neuen Knochens eingestuft wurde⁷⁰.

5.6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie wurden acht verschiedene Biomaterialien auf Basis von β -TCP und Monetit auf ihre Biokompatibilität, Resorptionsfähigkeit und Knochenneubildungsraten untersucht. Ihre Eignung für den klinischen Bedarf wurde geprüft. Alle untersuchten Biomaterialien waren biokompatibel, in unterschiedlichen Raten resorbierbar, führten zu guten Knochenneubildungsraten und wären grundsätzlich für klinische Anwendungen geeignet. Der Werkstoff β -TCP bewährte sich, abhängig von den architektonischen Eigenschaften der Implantate, als hervorragende Grundlage synthetischer Knochenersatzmaterialien. Und so erzielten die Materialien M3 und M4 die besten Resultate: Nach acht Wochen eine fast vollständige Resorption und Knochenheilung. Wurden mikroporöse Materialien eingesetzt, kam es zu einer Steigerung der Resorptionsraten. Die Verringerung der Korngröße hatte einen etwas geringeren Einfluss auf das Resorptionsverhalten der untersuchten Biomaterialien. Die Wichtigkeit einer hohen Makroporosität zeigte sich im Vergleich der β -TCP Implantate mit dem DCP Implantat. Obwohl DCP in vitro eine höhere Resorptionsrate hat als β -TCP, verlief der Abbau dieser Proben in vivo aufgrund circa 20% geringerer Makroporosität deutlich langsamer. Unterschiede im Resorptionsverhalten zwischen Biomaterialien mit sehr hohen Abbauraten konnten im biologischen System kaum nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, dass chemische Löslichkeitsunterschiede ab einer bestimmten Resorptionsgeschwindigkeit durch biologische Mechanismen abgeschwächt werden. Solche sehr schnell resorbierbaren Materialien waren die einzigen, für die eine Steigerung der Resorptionsrate nicht mit einer beschleunigten Knochenbildung einherging. Da das Implantat schneller abgebaut wurde als neuer Knochen gebildet werden konnte, fehlte die für dessen Apposition notwendige strukturelle Grundlage und die Knochenheilung wurde negativ beeinflusst. Die in dieser Studie gewonnenen Resultate sollten abschließend mit den Voraussagen des mathematischen Modells von Böhner und Baumgart verglichen werden⁶¹. Durch Verifizierung und gegebenenfalls Modifizierung theoretischer Modelle könnten die

Resultate dieser Studie künftig zusätzlich für Versuchsplanungen und Materialdesign genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Nuss KM, Auer JA, Boos A, et al: An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC musculoskeletal disorders* 7:67, 2006.
2. von Rechenberg B, Apelt D, Theiss F, et al: In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 25:1439-1451, 2004.
3. Böhner M: Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *materialstoday* 13:24-30, 2010.
4. Dobelin N, Luginbuhl R, Böhner M: Synthetic calcium phosphate ceramics for treatment of bone fractures. *Chimia* 64:723-729, 2010.
5. Moore WRG, S.E.; Bain G.I.: Synthetic Bone Graft Substitutes. *ANZ Journal of Surgery* 71, 2001.
6. Vallet-Regi M, Gonzalez-Calbet JM: Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry* 32:1-31, 2004.
7. Di Silvio L: Cellular response to biomaterials. Cambridge, Woodhead Publishing Limited, 2009.
8. Dorozhkin SV: Calcium orthophosphates. *Journal of Materials Science* 42:1061-1095, 2007.
9. Karageorgiou V, Kaplan D: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26:5474-5491, 2005.
10. Follet H, Boivin G, Rumelhart C, et al: The degree of mineralization is a determinant of bone strength. A study on human calcaneus. *Journal of Bone and Mineral Research* 18:S306-S306, 2003.
11. Einhorn T.A. LCA: Bone Regeneration: New Findings and Potential Clinical Applications. *Journal of the American academy of orthopaedic Surgeons* 9:157-165, 2001.
12. Böhner M: Design of Ceramic-Based Cements and Putties for Bone Graft Substitution. *European cells & materials* 20:1-12, 2010.
13. Epple M, Tadic D: A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 25:987-994, 2004.
14. Younger EM, Chapman MW: Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma* 3:192-195, 1989.
15. Draenert KW, F.G.; Garde, U.; Dreaert, Y.; Helber, U.; Börner, M.: Synthetische Knochenersatzstoffe auf HA- und TCP-Basis. *Trauma und Berufskrankheit* 3:293-300, 2001.
16. Bucholz RW: Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research*:44-52, 2002.
17. Böhner M: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury-International Journal of the Care of the Injured* 31:S37-S47, 2000.
18. Böhner MG, U.; Barralet, J.E.: Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials* 26:6423-6429, 2005.
19. Steffen T, Stoll T, Arvinte T, et al: Porous tricalcium phosphate and transforming growth factor used for anterior spine surgery. *European Spine Journal* 10:S132-S140, 2001.

20. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T: Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *Journal of biomaterials applications* 23:197-212, 2008.
21. Neo M, Nakamura T, Ohtsuki C, et al: Apatite Formation on 3 Kinds of Bioactive Material at an Early-Stage in-Vivo - a Comparative-Study by Transmission Electron-Microscopy. *Journal of biomedical materials research* 27:999-1006, 1993.
22. Yuan HP, Kurashina K, de Bruijn JD, et al: A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 20:1799-1806, 1999.
23. van Blitterswijk CA, Habibovic P, Yuan HP, et al: 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26:3565-3575, 2005.
24. Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, et al: Calcium phosphate bone cements for clinical applications - Part I: Solution chemistry. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 10:169-176, 1999.
25. Niedhart C, Maus U, Redmann E, et al: In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction. *Journal of biomedical materials research* 55:530-537, 2001.
26. Knaack D, Goad ME, Aiolo M, et al: Resorbable calcium phosphate bone substitute. *Journal of biomedical materials research* 43:399-409, 1998.
27. Ducheyne P, Qiu Q: Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20:2287-2303, 1999.
28. Hench LL: Bioceramics - from Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 74:1487-1510, 1991.
29. van Blitterswijk CAH, S.C.; Grote, J.J.; Koerten, H.K.; de Groot, K.: The biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: A study of retrieved human middle ear implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 24:433-453, 1990.
30. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, et al: BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. *Journal of biomedical materials research* 39:190-199, 1998.
31. Renooij W, ; Hoogendoorn, H.A.; Visser, W.J.; Lentferink, R.H.; Schmitz, M.G.; Van Ieperen, H.; Oldenburg, S.J.; Janssen, W.M.; Akkermans, L.M.; Wittebol, P.: Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora. A pilot study to quantitate bioresorption of ceramic implants of hydroxyapatite and tricalcium orthophosphate in vivo. *Clinical Orthopaedics and Related Research* Jul-Aug:272-285, 1985.
32. Albee FH: Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. *Annals of surgery* 71:32-39, 1920.
33. Lu JX, Gallur A, Flautre B, et al: Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *Journal of biomedical materials research* 42:357-367, 1998.
34. Koerten HK, van der Meulen J: Degradation of calcium phosphate ceramics. *Journal of biomedical materials research* 44:78-86, 1999.
35. Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, et al: Osseointegration of Macroporous Calcium-Phosphate Ceramics Having a Different Chemical-Composition. *Biomaterials* 14:423-429, 1993.
36. L.G. Galea MB, J. Lemaitre, T. Kohler, R. Müller: Bone substitute: Transforming β -tricalcium phosphate porous scaffolds into monetite. *Biomaterials* 29:3400-3407, 2008.

37. Lénárt G BG, Pintér J.: Some basic problems in the examination of the calcium hydrogen phosphates of bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 83:263-272, 1972.
38. Jarcho M: Calcium-Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. *Clinical Orthopaedics and Related Research*:259-278, 1981.
39. Kanatani M, Sugimoto T, Fukase M, et al: Effect of Elevated Extracellular Calcium on the Proliferation of Osteoblastic Mc3t3-E1 Cells - Its Direct and Indirect Effects Via Monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 181:1425-1430, 1991.
40. Keller JC, Chang YL, Stanford CM: Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: Implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *Journal of biomedical materials research* 52:270-278, 2000.
41. Metz LN, Martin RB, Turner AS: Histomorphometric analysis of the effects of osteocyte density on osteonal morphology and remodeling. *Bone* 33:753-759, 2003.
42. Teitelbaum SL: Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289:1504-1508, 2000.
43. Theiss F, Apelt D, Brand BA, et al: Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 26:4383-4394, 2005.
44. Constantz BR, Barr BM, Ison IC, et al: Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *Journal of biomedical materials research* 43:451-461, 1998.
45. Jansen JA, Ooms EM, Wolke JGC, et al: Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement. *Journal of biomedical materials research* 61:9-18, 2002.
46. Reindl S: Zelluläre Antwort auf die Implantation degradierbarer Knochenersatzmaterialien. 2011.
47. Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al: Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 10:111-120, 1999.
48. Lee CK, Chang BS, Hong KS, et al: Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 21:1291-1298, 2000.
49. von Doernberg MC, von Rechenberg B, Böhner M, et al: In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 27:5186-5198, 2006.
50. Uchida A, Nade SML, McCartney ER, et al: The Use of Ceramics for Bone-Replacement - a Comparative-Study of 3 Different Porous Ceramics. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 66:269-275, 1984.
51. Kuhne JH, Bartl R, Frisch B, et al: Bone-Formation in Coralline Hydroxyapatite - Effects of Pore-Size Studied in Rabbits. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 65:246-252, 1994.
52. Itälä AI YH, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT: Pore diameter of more than 100 micrometer is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res* 58:679-683, 2001.
53. Stangl R, Gotz HE, Muller M, et al: Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials* 25:4057-4064, 2004.
54. Flautre B, Descamps M, Delecourt C, et al: Porous HA ceramic for bone replacement: Role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 12:679-682, 2001.

55. Shimazaki KM, V.: Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *J Orthop Res* 3:301-310, 1985.
56. Galois LMD: Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study. *Acta Orthop Belg* 70:598-603, 2004.
57. Schliephake HN, F.W.; Klosa, D.: Influence of pore dimensions on bone ingrowth into porous hydroxylapatite blocks used as bone graft substitutes. A histometric study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 20:53-58, 1991.
58. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, et al: Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19:133-139, 1998.
59. Hulbert SF YF, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH: Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research* 4:433-456, 1970.
60. Cyster LA, Grant DM, Howdle SM, et al: The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26:697-702, 2005.
61. Böhner M, Baumgart F: Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials* 25:3569-3582, 2004.
62. Quarto R, Mastrogiacomo M, Scaglione S, et al: Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 27:3230-3237, 2006.
63. Johnson AJW, Levengood SKL, Polak SJ, et al: Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials* 31:3552-3563, 2010.
64. Lewis JA, Simon JL, Michna S, et al: In vivo bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds assembled by direct ink writing. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 83A:747-758, 2007.
65. Böhner M, Loosli Y, Baroud G, et al: Commentary: Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. *Acta biomaterialia* 7:478-484, 2011.
66. Yokozeaki H, Hayashi T, Nakagawa T, et al: Influence of surface microstructure on the reaction of the active ceramics in vivo. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 9:381-384, 1998.
67. Pearce AI, Richards RG, Milz S, et al: Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European cells & materials* 13:1-10, 2007.
68. Buma P, Schreurs W, Verdonschot N: Skeletal tissue engineering-from in vitro studies to large animal models. *Biomaterials* 25:1487-1495, 2004.
69. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, et al: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139:663-670, 1998.
70. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, et al: Role of bone substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research*:55-65, 1996.
71. Grynblas MD, Pilliar RM, Kandel RA, et al: Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications in vivo studies. *Biomaterials* 23:2063-2070, 2002.
72. De Groot K: Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption, and strength of calcium phosphate ceramics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 523:227-233, 1988.

73. Zhang PH, K.; Yokota, H.: A Brief Review of Bone Adaption to Unloading. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 6:4-7, 2008.
74. Lacroix D, Milan JL, Planell JA: Computational modelling of the mechanical environment of osteogenesis within a polylactic acid-calcium phosphate glass scaffold. *Biomaterials* 30:4219-4226, 2009.
75. Roshan-Gias AV, A.; Rakotomanana, L.; Pioletti, D.P.: Prediction of spatio-temporal bone formation in scaffold by diffusion equation. *Biomaterials* 32:7006-7012, 2011.
76. Baroud G, Bashoor-Zadeh M, Böhner M: Geometric analysis of porous bone substitutes using micro-computed tomography and fuzzy distance transform. *Acta biomaterialia* 6:864-875, 2010.
77. Böhner M, van Lenthe GH, Grunfelder S, et al: Synthesis and characterization of porous beta-tricalcium phosphate blocks. *Biomaterials* 26:6099-6105, 2005.
78. Hollister SJ: Scaffold Design and Manufacturing: From Concept to Clinic. *Advanced Materials* 21:3330-3342, 2009.
79. Chu TMG, Orton DG, Hollister SJ, et al: Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials* 23:1283-1293, 2002.
80. C.E. Wilson CAvB, A.J. Verbout, W.J.A. Dhert, J.D. de Bruijn: Scaffolds with a standardized macro-architecture fabricated from several calcium phosphate ceramics using an indirect rapid prototyping technique. *Journal of Materials Science* 22:97-105, 2011.
81. Hollister SJ, Lin CY, Kikuchi N: A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elastic properties with desired porosity. *Journal of Biomechanics* 37:623-636, 2004.
82. Descamps M, Richart O, Hardouin P, et al: Synthesis of macroporous beta-tricalcium phosphate with controlled porous architectural. *Ceramics International* 34:1131-1137, 2008.
83. Martini L, Fini M, Giavaresi G, et al: Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comparative Medicine* 51:292-299, 2001.
84. Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti GC, et al: Mineral evolution of bone. *Biomaterials* 17:617-622, 1996.
85. Sarkar MR, Wachter N, Patka P, et al: First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. *Journal of biomedical materials research* 58:329-334, 2001.
86. den Boer FC, Patka P, Bakker FC, et al: New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 17:654-660, 1999.
87. Doernberg MC: Evaluation of the Biodegradation Behaviour of β -TCP Cylinders With Four Different Pore Diameters. An in vivo Study. *Vetsuisse Fakultät Zürich*, 2005.
88. Apelt D: In-Vivo Studie zweier injizierbarer Kalzium-Phosphat-Zemente; histologische und histomorphometrische Evaluation. *Vetsuisse Fakultät Zürich*, 2003.
89. Kühn K: Biokompatibilität verschiedener Kompositionen als Knochenersatzstoffe. Eine Studie am Schaf.: *Vetsuisse Fakultät*, 2007.
90. Génot OR: Evaluation von vier biodegradierbaren, injizierbaren Knochenzementen in einer experimentellen Studie in Schafen. *Vetsuisse Fakultät Zürich*, 2006.

91. Oberle A, Theiss F, Böhner M, et al: Investigation about the clinical use of brushite-and hydroxylapatite-cement in sheep. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 147:482-490, 2005.
92. Kemper M: Screeningversuch zur Optimierung synthetischer und fibriner Hydrogele als dreidimensionale Trägersubstanz für Bone Morphogenetic Protein, Transforming Growth Factor β und Parathormon zur Beschleunigung der Knochenheilung. UZH, 2003.
93. Phemister D: The fate of transplanted bone and regenerative power of various constituents. Surg Gynecol Obstet 19:303-333, 1914.
94. Athanasou NA: Colour Atlas of Bone, Joint, and Soft Tissue Pathology. Oxford, Oxford University Press, 1999.
95. Ratner BD, ; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E.: Biomaterials Science- An Introduction to Materials and Medicine. San Diego, Elsevier Inc., 2004.
96. Chang DT, Jones JA, Meyerson H, et al: Lymphocyte/macrophage interactions: Biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. Journal of Biomedical Materials Research Part A 87A:676-687, 2008.
97. Lassus J, Salo J, Jiranek WA, et al: Macrophage activation results in bone resorption. Clinical Orthopaedics and Related Research:7-15, 1998.
98. Hollinger JO, Battistone GC: Biodegradable Bone Repair Materials - Synthetic-Polymers and Ceramics. Clinical Orthopaedics and Related Research:290-305, 1986.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellen

7.1.1 Materialcharakterisierung und Probenverteilung

Tab. 1	Übersicht über Bezeichnung und Applikationsform der untersuchten Implantate
Tab. 2	Angabe der chemischen Zusammensetzung, der Korngröße und der spezifischen Oberfläche der untersuchten Implantate
Tab. 3	Angabe der Porosität, der Makroporosität, der Mikroporosität und der Interkonnektivität der untersuchten Implantate
Tab. 4	Angabe der Implantationsorte der Materialien M1 bis M8 (1-8)

7.1.2 Resultate

7.1.2.1 Semiquantitative Untersuchung (Abschnitt 7.1.1)

Tab. 5	Ergebnisse und Standardabweichungen der Schätzung der Flächenanteile des neugebildeten Knochens, des Implantats und des Weichteilgewebes; Angabe der Ergebnisse nach zwei, vier und acht Wochen für die Materialien M1 bis M8; Angaben in Prozent
Tab. 6	Übersicht über die signifikanten Unterschiede der Resultate aus Tabelle 5; Signifikanzen ermittelt im Post Hoc Test nach Scheffe
Tab. 7	Übersicht über die signifikanten Korrelationen der Resultate aus Tabelle 5; Signifikanzen ermittelt im Korrelationstest nach Pearson
Tab. 8	Ergebnisse und Standardabweichungen der Schätzung der Flächenanteile in den Zonen 1 bis 3 (Z1- Z3) des neugebildeten Knochens, des Implantats und des Weichteilgewebes; Angabe der Ergebnisse nach zwei, vier und acht Wochen für die Materialien M1 bis M8; Angaben in Prozent
Tab. 9	Aufschlüsselung der Komponenten Granulationsgewebe, Fettgewebe und Bindegewebe am Weichteilgewebe, Angaben in Prozent

7.1.2.2 Untersuchungen zu Zellgehalt und Verteilung

Tab. 10	Zusammenfassung der Werte aus Tabelle 12, Gesamtzellzahl ergibt sich aus der Addition der für die Zonen 1 bis 4 (Z1- Z4) bestimmten Zellzahlen; Angabe der Gesamtzellzahlen der Fremdkörperriesenzellen, der Makrophagen, der lymphoplasmazellulären Zellen und der Osteoklasten; Angaben als absolute Zahlen
----------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tab. 11	Signifikante Korrelationen der Gesamtzellzahlen aus dem Korrelations-test nach Pearson
Tab. 12	Resultate der Zellzählung (Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen, Osteoklasten); Angabe der Resultate aus vier Zonen (Z1-Z4) über die Zeiträume zwei, vier und acht Wochen für die Materialien M1 bis M8; Angaben als absolute Zahlen
Tab. 13	Standardabweichungen der Ergebnisse aus Tabelle 12

7.1.2.3 Histomorphometrie

Tab. 14	Ergebnisse der histomorphometrischen Messung der Flächenanteile des neugebildeten Knochens, des Implantats und des Weichteilgewebes in Ebene A und B nach zwei, vier und acht Wochen für die Materialien M1 bis M8; Angaben in Prozent
Tab. 15	Übersicht über die signifikanten Unterschiede der Resultate aus Tabelle 14; Signifikanzen bestimmt im Post Hoc Test nach Scheffe
Tab. 16	Signifikante Korrelationen der Resultate aus Tabelle 14 aus dem Korrelationstest nach Pearson

7.2 Abbildungen

Abb. 1	Verteilungsdiagramme der Größe der Makroporen für die Materialien M1 bis M8
Abb. 2	Darstellung der Schnittebenen A und B
Abb. 3 u. 4	Darstellung der Auswertungsbereiche für die semiquantitative Schätzung der Flächenanteile (Zone 1 bis 3) und Darstellung der Gesichtsfelder für die Zellzählung (Zone 1 bis 4)
Abb. 5 u. 6	Lagerung der Vorder- und Hintergliedmaßen für die Operationen
Abb. 7	Darstellung des Spezialinstrumentariums für die Operationen nach dem Drillholemodell
Abb. 8	Probenvorbereitung für die Implantation: sterile Verpackung und eindeutige Kennzeichnung
Abb. 9	Darstellung der Kerbe eines Probenzylinders zur späteren Bestimmung der Implantatausrichtung im μ -CT
Abb. 10 u. 11	Vorbereitung des Granulats für die Implantation: Einfüllen in den Applikationstrokar und Wässern mit Natriumchloridlösung (0,9%)
Abb. 12 u.13	Setzen eines Bohrlochs unter Zuhilfenahme des Spezial-

	instrumentariums und Darstellung eines Bohrdefeks
Abb. 14 u. 15	Insertion eines Implantats in den Bohrdefekt unter Zuhilfenahme des Spezialinstrumentariums und Darstellung einer implantierten Probe
Abb. 16	Fotografie eines Bohrlochs nach der Schlachtung; Aufnahme des proximalen Humerus eines Tiers aus der zwei Wochen Gruppe
Abb. 17	Darstellung eines post mortem angefertigten Röntgenbildes, Anwendung zur Probenlokalisierung
Abb. 18-25	Beispiele für Mikroradiografien der Proben; Darstellung jeweils eines Bildes der Materialien M1 bis M8 nach acht Wochen
Abb. 26-33	Beispiele für Fluoreszenzbilder; Darstellung jeweils eines Bildes der Materialien M1 bis M8 aus der acht Wochen Gruppe
Abb. 34-41	Beispiele für Dickschnitte; Darstellung jeweils eines Bildes der Materialien M1 bis M8 aus der acht Wochen Gruppe
Abb. 42	Granulationsgewebe in den Makroporen eines Implantats; van Kossa/Mc Neal
Abb. 43	Osteoidbildung und Kalzifizierung an der Grenzfläche von Granulationsgewebe und Implantat; van Kossa/Mc Neal
Abb. 44	Darstellung der Bildung neuen Knochengewebes in den Makroporen des Implantats; Toluidinblau
Abb. 45	Darstellung des Einschlusses von Implantatresten in die neugebildeten Knochenstrukturen; Toluidinblau
Abb. 46	Bildung des Osteoids durch Osteoblasten; Toluidinblau
Abb. 47	Implantatabbau durch Fremdkörperriesenzellen; van Kossa/Mc Neal
Abb. 48	Implantatabbau durch Makrophagen; van Kossa/Mc Neal
Abb. 49	Umbau des Knochens durch Osteoklasten; Toluidinblau

8 Anhang

8.1 Tabellarische Übersichten der Ergebnisse

8.1.1 Semiquantitative Untersuchung

Tab. 5: Ergebnisse und Standardabweichungen der Schätzung der Flächenanteile des neugebildeten Knochens, des Implantats und des Weichteilgewebes; Angabe der Ergebnisse nach zwei, vier und acht Wochen für die Materialien M1 bis M8; Angaben in Prozent

		Ebene B		
		% neugebildeter Knochen	% Implantat	% Weichteilgewebe
zwei Wochen	M1	4.50 ± 2.36	17.70 ± 2.14	78.33 ± 2.94
	M2	6.60 ± 3.51	20.60 ± 5.64	72.80 ± 5.89
	M3	8.17 ± 2.86	17.83 ± 8.01	74.00 ± 7.27
	M4	7.00 ± 7.21	16.17 ± 9.56	76.83 ± 4.79
	M5	3.60 ± 3.78	25.00 ± 5.00	71.40 ± 7.70
	M6	4.67 ± 2.88	21.00 ± 2.53	74.33 ± 3.44
	M7	2.83 ± 2.04	41.67 ± 4.08	56.00 ± 5.73
	M8	6.83 ± 4.91	15.83 ± 7.36	77.33 ± 8.64
vier Wochen	M1	27.50 ± 12.55	6.17 ± 3.74	66.33 ± 10.71
	M2	21.25 ± 8.54	9.25 ± 4.35	69.50 ± 5.26
	M3	18.00 ± 9.70	14.00 ± 3.46	66.00 ± 12.25
	M4	30.83 ± 7.36	11.17 ± 5.31	56.33 ± 7.66
	M5	17.40 ± 18.61	16.60 ± 10.02	66.00 ± 10.84
	M6	13.00 ± 7.56	18.17 ± 3.71	68.83 ± 7.17
	M7	7.83 ± 1.60	35.33 ± 8.14	56.83 ± 8.75
	M8	15.50 ± 14.67	7.83 ± 2.48	76.67 ± 15.41
acht Wochen	M1	31.33 ± 18.89	2.50 ± 2.74	66.17 ± 16.19
	M2	43.33 ± 15.06	5.50 ± 5.05	51.17 ± 16.44
	M3	45.00 ± 12.75	10.00 ± 6.12	45.00 ± 11.18
	M4	42.50 ± 18.37	6.50 ± 1.98	51.00 ± 17.62
	M5	17.33 ± 8.78	10.33 ± 4.08	72.33 ± 11.64
	M6	17.83 ± 12.09	9.17 ± 3.76	73.00 ± 15.03
	M7	20.00 ± 7.07	23.75 ± 8.54	56.25 ± 6.29
	M8	21.67 ± 22.98	3.67 ± 1.03	74.67 ± 22.58

Tab. 6: Übersicht über die signifikanten Unterschiede der Resultate aus Tabelle 5; Signifikanzen ermittelt im Post Hoc Test nach Scheffe

Implantations- zeitraum	untersuchte Komponente	Material	verhält sich signifikant unterschiedlich zu	P-Wert	Bewertung nach Score
Zwei Wochen	neugebildeter Knochen			keine Sig.	
	Implantat	M7	M1	0.000	3+
			M2	0.024	1+
			M3	0.001	3+
			M4	0.000	3+
			M6	0.015	1+
			M8	0.000	3+
	Weichteilgewebe			keine Sig.	
Vier Wochen	neugebildeter Knochen			keine Sig.	
	Implantat	M7	M1	0.000	3+
			M2	0.001	3+
			M3	0.008	2+
			M4	0.000	3+
			M8	0.000	3+
	Weichteilgewebe			keine Sig.	
Acht Wochen	neugebildeter Knochen			keine Sig.	
	Implantat			keine Sig.	
	Weichteilgewebe			keine Sig.	

Score:

p ≤ 0.001 3+

p ≤ 0.010 2+

p ≤ 0.050 1+

Tab. 7: Übersicht über die signifikanten Korrelationen der Resultate aus Tabelle 5; Signifikanzen ermittelt im Korrelationstest nach Pearson

Komponente	korreliert mit	Korrelationskoeffizient	p-Wert
Neugebildeter Knochen	Implantat	-0.531	0.000
	Weichteilgewebe	-0.761	0.000

Tab. 8: Ergebnisse und Standardabweichungen der Schätzung der Flächenanteile in den Zonen 1 bis 3 (Z1- Z3) des neugebildeten Knochens, des Implantats und des Weichteilgewebes; Angabe der Ergebnisse nach zwei, vier und acht Wochen für die Materialien M1 bis M8; Angaben in Prozent

zwei Wochen									
% Neugebildeter Knochen			% Implantat			% Weichteilgewebe			
Z 1	Z 2	Z 3	Z 1	Z 2	Z 3	Z 1	Z 2	Z 3	
M1	12.5 ± 6.5	2.5 ± 2.9	1.3 ± 2.5	10.8 ± 5.6	16.5 ± 2.4	17.8 ± 2.6	76.8 ± 5.6	81.0 ± 2.7	81.0 ± 2.7
M2	14.0 ± 6.6	0.0 ± 0	0.0 ± 0	16.7 ± 2.9	20.0 ± 0	23.3 ± 5.8	69.3 ± 4.0	80.0 ± 0	76.7 ± 5.8
M3	17.5 ± 5.0	3.8 ± 4.8	2.5 ± 5.0	15.0 ± 10.8	16.3 ± 11.1	17.5 ± 8.7	52.5 ± 32.8	75.0 ± 4.1	80.0 ± 10.8
M4	15.0 ± 14.9	0.0 ± 0	0.0 ± 0	12.3 ± 11.1	17.0 ± 6.6	17.0 ± 8.0	72.7 ± 8.8	83.0 ± 6.6	83.0 ± 8.0
M5	2.7 ± 2.5	0.0 ± 0	0.0 ± 0	18.3 ± 5.8	26.0 ± 3.6	26.0 ± 3.6	79.0 ± 3.6	74.0 ± 3.7	74.0 ± 3.6
M6	5.3 ± 3.3	0.8 ± 2.0	0.0 ± 0	14.2 ± 4.9	19.7 ± 2.6	21.3 ± 2.2	79.7 ± 6.1	79.5 ± 3.4	78.7 ± 2.2
M7	6.2 ± 4.5	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0	32.5 ± 4.2	40.0 ± 0	40.0 ± 0	61.3 ± 7.1	59.7 ± 0.8	60.0 ± 0
M8	11.7 ± 9.9	0.8 ± 2.0	0.0 ± 0	9.8 ± 6.2	11.7 ± 4.1	8.8 ± 6.2	78.5 ± 10.0	87.5 ± 4.2	91.2 ± 6.2
vier Wochen									
% Neugebildeter Knochen			% Implantat			% Weichteilgewebe			
Z 1	Z 2	Z 3	Z 1	Z 2	Z 3	Z 1	Z 2	Z 3	
M1	41.7 ± 17.2	20.8 ± 13.6	11.7 ± 11.7	1.3 ± 2.2	5.0 ± 3.2	7.5 ± 4.2	55.3 ± 14.2	74.2 ± 12.0	80.8 ± 9.2
M2	35.0 ± 10.0	13.8 ± 16.0	5.0 ± 10.0	3.8 ± 2.5	11.8 ± 5.7	12.0 ± 7.3	61.3 ± 9.5	74.5 ± 12.8	83.0 ± 5.7
M3	26.0 ± 5.5	13.0 ± 8.4	6.0 ± 4.2	11.0 ± 5.5	12.8 ± 4.1	12.0 ± 4.5	65.0 ± 10.0	74.2 ± 12.1	82.0 ± 8.4
M4	38.3 ± 6.8	25.8 ± 12.4	17.5 ± 13.0	6.7 ± 4.1	11.2 ± 5.3	10.8 ± 5.8	55.0 ± 10.5	64.7 ± 10.0	71.7 ± 12.7
M5	25.0 ± 13.2	4.3 ± 5.1	15.0 ± 21.8	7.3 ± 8.7	11.7 ± 10.4	11.7 ± 10.4	66.0 ± 16.4	84.0 ± 15.1	73.3 ± 12.6
M6	21.0 ± 5.5	13.0 ± 7.6	4.6 ± 1.7	15.0 ± 8.5	15.0 ± 3.1	15.0 ± 3.1	64.0 ± 10.2	72.0 ± 7.8	80.4 ± 4.0
M7	13.2 ± 4.5	2.8 ± 4.0	0.8 ± 2.0	30.5 ± 6.7	33.7 ± 4.3	34.2 ± 4.7	56.3 ± 8.0	63.5 ± 7.6	63.3 ± 5.5
M8	19.7 ± 18.0	13.0 ± 16.0	6.8 ± 8.5	6.2 ± 3.8	6.2 ± 2.4	7.8 ± 2.5	75.0 ± 18.5	80.8 ± 14.4	85.3 ± 9.0
acht Wochen									
% Neugebildeter Knochen			% Implantat			% Weichteilgewebe			
Z 1	Z 2	Z 3	Z 1	Z 2	Z 3	Z 1	Z 2	Z 3	
M1	34.2 ± 17.4	27.8 ± 21.0	27.5 ± 18.9	1.3 ± 2.2	2.5 ± 2.7	1.7 ± 2.6	64.5 ± 15.9	69.7 ± 18.3	70.8 ± 17.2
M2	49.2 ± 9.7	38.3 ± 24.0	40.8 ± 23.8	5.5 ± 5.1	5.5 ± 5.1	4.3 ± 5.6	45.3 ± 9.0	54.5 ± 23.4	54.8 ± 25.5
M3	51.0 ± 10.2	43.0 ± 10.4	38.0 ± 15.2	9.0 ± 5.5	10.0 ± 6.1	12.0 ± 9.1	40.0 ± 7.1	47.0 ± 12.0	52.0 ± 19.2
M4	45.8 ± 19.3	44.2 ± 13.9	29.2 ± 25.4	5.3 ± 3.3	6.2 ± 2.0	5.0 ± 1.3	48.8 ± 21.0	49.7 ± 13.6	60.8 ± 23.7
M5	21.4 ± 14.0	15.4 ± 9.5	16.0 ± 9.6	6.6 ± 5.9	10.0 ± 3.5	10.0 ± 3.5	72.0 ± 17.9	74.6 ± 12.4	76.0 ± 7.4
M6	27.0 ± 20.5	13.6 ± 11.3	8.0 ± 12.6	7.0 ± 5.7	5.4 ± 5.7	8.0 ± 9.1	66.0 ± 19.2	81.0 ± 15.5	84.0 ± 17.8
M7	27.5 ± 12.6	15.0 ± 7.1	8.8 ± 14.4	26.3 ± 4.8	25.0 ± 8.2	21.3 ± 11.9	46.3 ± 9.5	60.0 ± 7.1	70.0 ± 7.1
M8	29.2 ± 22.0	18.0 ± 23.1	18.3 ± 25.4	2.3 ± 2.9	2.2 ± 1.9	3.2 ± 1.8	68.5 ± 20.9	79.8 ± 23.3	78.5 ± 26.0

Tab. 9: Aufschlüsselung der Komponenten Granulationsgewebe, Fettgewebe und Bindegewebe am Weichteilgewebe, Angaben in Prozent

		% Granulationsgewebe	% Fettgewebe	% Bindegewebe
zwei Wochen	M1	77.3 ± 2.9	0.0 ± 0	0.0 ± 0
	M2	70.8 ± 8.3	2.0 ± 4.5	0.0 ± 0
	M3	74.0 ± 7.3	0.0 ± 0	0.0 ± 0
	M4	76.8 ± 4.8	0.0 ± 0	0.0 ± 0
	M5	71.4 ± 7.7	0.0 ± 0	0.0 ± 0
	M6	72.7 ± 6.8	1.7 ± 4.1	3.3 ± 8.2
	M8	67.3 ± 21.2	0.0 ± 0	10.0 ± 15.8
vier Wochen	M1	60.5 ± 14.8	5.0 ± 7.7	0.8 ± 2.0
	M2	61.3 ± 11.8	7.5 ± 15.0	0.8 ± 1.5
	M3	57.3 ± 13.8	2.1 ± 5.1	6.7 ± 16.3
	M4	44.7 ± 15.3	11.7 ± 11.3	0.0 ± 0
	M5	47.6 ± 27.9	5.0 ± 11.2	13.4 ± 13.9
	M6	50.2 ± 18.6	4.8 ± 11.8	13.8 ± 17.3
	M8	55.0 ± 23.8	13.3 ± 16.3	8.3 ± 13.3
acht Wochen	M1	12.5 ± 16.1	48.7 ± 5.4	5.0 ± 8.4
	M2	11.7 ± 20.4	37.0 ± 12.8	2.5 ± 4.2
	M3	7.0 ± 11.0	32.0 ± 11.5	7.0 ± 13.0
	M4	9.7 ± 8.4	38.0 ± 15.9	4.2 ± 4.2
	M5	28.2 ± 16.0	44.2 ± 14.0	0.0 ± 0
	M6	18.3 ± 29.1	48.0 ± 30.1	6.7 ± 10.3
	M8	16.2 ± 17.4	50.8 ± 21.7	7.7 ± 13.7

8.1.2 Untersuchungen zu Zellgehalt und -verteilung

Tab. 10: Zusammenfassung der Werte aus Tabelle 12, Gesamtzellzahl ergibt sich aus der Addition der für die Zonen 1 bis 4 (Z1- Z4) bestimmten Zellzahlen; Angabe der Gesamtzellzahlen der Fremdkörperriesenzellen, der Makrophagen, der Lymphoplasmazellulären und der Osteoklasten; Angaben als absolute Zahlen

zwei Wochen				
	Fremdkörperriesenzellen	Makrophagen	Lymphozyten/ Plasmazellen	Osteoklasten
M1	19.8	35	37.63	7.2
M2	12	23.16	37.5	3.5
M3	17.17	20.34	81.84	8
M4	6.34	20.51	39	4.34
M5	32	26.25	65	3.25
M6	27.17	25.5	28.17	3.5
M7	13.66	25.33	22.34	6
M8	6.34	26.5	3.7	17.5
vier Wochen				
	Fremdkörperriesenzellen	Makrophagen	Lymphozyten/ Plasmazellen	Osteoklasten
M1	16.8	21.6	44.2	10
M2	29.25	24	22.75	9.75
M3	16.5	33.17	28.83	9.17
M4	9.67	21	24.66	10.67
M5	6.4	20	28.8	6.4
M6	13.83	19.34	42.5	8.16
M7	16.5	21.25	11.75	9.5
M8	7.9	33.5	8.5	14.2
acht Wochen				
	Fremdkörperriesenzellen	Makrophagen	Lymphozyten/ Plasmazellen	Osteoklasten
M1	3.33	11.17	11	10.67
M2	0.34	9.67	12.34	9.17
M3	0.6	16.8	3.4	11.8
M4	1.5	19.49	25.5	12
M5	1.99	23.16	11.83	8.16
M6	9.34	16.67	35.99	10.17
M7	1.8	41.8	49.8	11.4
M8	1.7	30.7	9.0	27.5

Tab. 11: Signifikante Korrelationen der Gesamtzellzahlen, Korrelationstest nach Pearson

Zelltyp	korreliert mit	Korrelationskoeffizient	p-Wert
Fremdkörperriesenzellen	Makrophagen	0.019	0.025
	Osteoklasten	-0.229	0.007
Makrophagen	Osteoklasten	-0.260	0.002
Lymphozyten/ Plasmazellen	Osteoklasten	-0.231	0.006

Tab. 12: Resultate der Zellzählung (Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen, Osteoklasten); Angabe der Resultate aus vier Zonen (Z1-Z4) über die Zeiträume; Angaben als absolute Zahlen

zwei Wochen																
Fremdkörperriesenzellen				Makrophagen				Lymphozyten/ Plasmazellen				Osteoklasten				
Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	
M1	3.8	7.8	4.8	3.4	9.0	9.6	9.8	6.6	10.6	8.8	8.8	9.4	5.8	1.4	0.0	0.0
M2	3.0	5.0	1.5	2.5	8.0	4.5	5.8	4.8	13.7	8.5	9.5	5.8	2.8	0.5	0.2	0.0
M3	4.7	5.7	3.5	3.3	5.8	6.7	3.7	4.2	72.0	3.5	2.7	3.7	5.7	1.8	0.3	0.2
M4	1.8	2.2	1.7	0.7	4.2	6.2	5.0	5.2	12.0	13.3	10.5	3.2	3.2	1.2	0.0	0.0
M5	5.8	13.0	6.0	7.3	7.0	9.3	6.0	4.0	7.3	29.5	18.5	9.8	2.8	0.5	0.0	0.0
M6	6.0	9.7	7.0	4.5	4.5	9.0	7.0	5.0	11.5	3.2	7.5	6.0	2.7	0.3	0.3	0.2
M7	0.3	4.3	7.0	2.0	6.3	6.0	6.3	6.7	9.7	3.3	3.7	5.7	2.7	3.3	0.0	0.0
M8	0.2	0.7	1.8	3.7	5.3	10.5	6.0	4.7	4.7	4.7	1.3	6.8	2.5	1.2	0.0	0.0
vier Wochen																
Fremdkörperriesenzellen				Makrophagen				Lymphozyten/ Plasmazellen				Osteoklasten				
Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	
M1	0.8	3.4	5.4	7.2	3.6	5.0	6.4	6.6	17.8	4.6	13.6	8.2	3.0	3.6	2.0	1.4
M2	2.8	5.0	8.3	13.3	5.0	6.3	5.3	7.5	2.5	17.5	0.5	2.3	4.8	1.8	2.5	0.8
M3	1.5	6.7	4.5	3.8	6.2	10.2	8.3	8.5	22.0	4.3	2.2	0.3	2.0	4.7	1.8	0.7
M4	0.8	4.7	2.5	1.7	4.2	7.3	4.2	5.3	3.5	5.5	5.8	9.8	4.3	3.2	2.0	1.2
M5	0.4	2.8	2.0	1.2	3.4	8.4	4.6	3.6	20.2	6.2	1.2	1.2	3.2	2.0	1.0	0.2
M6	0.8	2.3	5.2	5.5	4.7	6.7	4.3	3.7	25.2	3.8	3.5	10.0	2.8	1.8	2.2	1.3
M7	1.5	2.0	5.5	7.5	4.5	5.3	5.8	5.8	6.8	0.8	2.3	2.0	2.3	3.0	2.0	2.3
M8	1.0	2.2	2.2	2.5	4.0	10.8	8.7	10.0	3.0	3.0	4.8	3.3	2.7	3.0	2.0	0.8
acht Wochen																
Fremdkörperriesenzellen				Makrophagen				Lymphozyten/ Plasmazellen				Osteoklasten				
Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	
M1	0.0	0.8	1.2	1.3	0.3	2.5	3.2	5.2	0.7	1.7	3.8	4.8	3.0	2.7	2.2	2.8
M2	0.0	0.0	0.2	0.2	1.2	1.0	3.3	4.2	1.0	1.7	3.2	6.5	2.0	2.5	2.2	2.5
M3	0.2	0.0	0.2	0.2	0.4	2.8	7.6	6.0	1.8	0.6	0.4	0.6	2.2	3.4	3.0	3.2
M4	0.0	0.0	0.8	0.7	0.8	4.3	7.8	6.5	3.8	2.7	5.2	13.8	3.2	3.3	3.2	2.3
M5	0.0	0.3	0.3	1.3	1.8	2.0	8.8	10.5	0.0	2.0	5.0	4.8	2.3	2.0	2.0	1.8
M6	0.3	1.2	6.7	1.2	1.2	3.0	8.3	4.2	0.5	13.3	16.8	5.3	1.5	2.5	2.7	3.5
M7	0.0	0.2	1.2	0.4	2.6	12.8	14.4	12.0	7.0	14.4	19.0	9.4	3.0	3.0	2.8	2.6
M8	0.0	0.2	0.8	0.7	0.3	8.8	11.0	10.5	1.5	7.3	7.5	11.2	2.2	2.8	2.2	1.8

Tab. 13: Standardabweichungen der Ergebnisse aus Tabelle 12

zwei Wochen																
Fremdkörperriesenzellen				Makrophagen				Lymphozyten/ Plasmazellen				Osteoklasten				
Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	
M1	± 4.6	± 5.2	± 2.6	± 2.1	± 5.3	± 10.4	± 8.7	± 2.7	± 15.2	± 13.0	± 11.1	± 11.0	± 3.0	± 1.5	± 0.0	± 0.0
M2	± 3.1	± 4.7	± 1.2	± 3.8	± 4.4	± 1.6	± 2.3	± 1.9	± 14.9	± 7.6	± 8.8	± 6.3	± 1.0	± 0.8	± 0.4	± 0.0
M3	± 3.4	± 3.4	± 1.6	± 3.5	± 3.4	± 8.5	± 1.2	± 2.2	± 165.6	± 7.2	± 4.5	± 5.0	± 2.7	± 1.7	± 0.8	± 0.4
M4	± 2.2	± 1.5	± 2.4	± 0.8	± 0.8	± 2.0	± 1.4	± 2.6	± 21.8	± 13.6	± 7.2	± 3.8	± 1.9	± 1.2	± 0.0	± 0.0
M5	± 4.3	± 9.3	± 9.3	± 13.8	± 3.7	± 8.7	± 2.8	± 2.4	± 10.0	± 36.0	± 16.5	± 9.6	± 1.0	± 0.6	± 0.0	± 0.0
M6	± 7.2	± 8.4	± 8.6	± 6.1	± 0.5	± 8.4	± 4.2	± 3.7	± 15.7	± 6.4	± 12.0	± 4.3	± 1.0	± 0.8	± 0.8	± 0.4
M7	± 0.6	± 3.1	± 7.9	± 1.0	± 4.9	± 0.0	± 2.5	± 2.9	± 10.0	± 3.1	± 0.6	± 5.1	± 2.1	± 1.5	± 0.0	± 0.0
M8	± 0.4	± 0.8	± 1.7	± 4.0	± 4.2	± 5.0	± 2.1	± 3.4	± 10.2	± 10.0	± 3.3	± 7.4	± 0.5	± 1.5	± 0.0	± 0.0
vier Wochen																
Fremdkörperriesenzellen				Makrophagen				Lymphozyten/ Plasmazellen				Osteoklasten				
Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	
M1	± 1.3	± 4.5	± 4.4	± 7.3	± 2.7	± 3.2	± 5.2	± 4.8	± 37.6	± 7.6	± 19.1	± 10.6	± 2.8	± 2.5	± 1.8	± 2.1
M2	± 3.4	± 5.3	± 5.6	± 12.0	± 2.1	± 4.0	± 2.1	± 2.6	± 5.0	± 35.0	± 1.0	± 2.6	± 5.0	± 1.0	± 2.1	± 1.0
M3	± 1.4	± 7.4	± 4.0	± 5.1	± 3.3	± 4.8	± 3.1	± 7.0	± 38.7	± 4.8	± 4.0	± 0.8	± 1.3	± 4.0	± 1.0	± 1.6
M4	± 0.4	± 5.9	± 3.1	± 1.4	± 3.3	± 6.9	± 4.2	± 2.2	± 3.2	± 8.1	± 9.8	± 13.6	± 4.1	± 1.6	± 1.1	± 1.5
M5	± 0.9	± 3.0	± 2.9	± 2.2	± 2.2	± 10.4	± 3.6	± 2.2	± 44.6	± 5.9	± 1.6	± 2.7	± 3.3	± 1.4	± 1.2	± 0.5
M6	± 1.2	± 3.1	± 3.2	± 4.8	± 3.3	± 5.6	± 2.1	± 1.9	± 31.2	± 4.5	± 6.8	± 22.1	± 0.8	± 1.8	± 0.9	± 0.5
M7	± 1.7	± 0.8	± 6.4	± 4.4	± 3.7	± 1.3	± 1.7	± 2.9	± 9.1	± 1.5	± 1.7	± 1.4	± 1.3	± 1.4	± 2.2	± 3.3
M8	± 2.4	± 2.6	± 2.3	± 2.2	± 3.3	± 7.8	± 5.6	± 4.8	± 4.4	± 4.7	± 9.0	± 3.7	± 1.2	± 1.1	± 1.3	± 0.9
acht Wochen																
Fremdkörperriesenzellen				Makrophagen				Lymphozyten/ Plasmazellen				Osteoklasten				
Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	Z 1	Z 2	Z 3	Z 4	
M1	± 0.0	± 1.6	± 2.0	± 2.3	± 0.8	± 2.8	± 2.9	± 4.8	± 1.6	± 2.7	± 4.9	± 6.0	± 1.3	± 1.0	± 1.2	± 1.8
M2	± 0.0	± 0.0	± 0.4	± 0.4	± 1.8	± 1.1	± 3.7	± 7.9	± 2.5	± 2.1	± 4.7	± 8.4	± 0.9	± 1.0	± 1.5	± 2.1
M3	± 0.4	± 0.0	± 0.4	± 0.4	± 0.5	± 2.3	± 8.6	± 3.7	± 3.0	± 1.3	± 0.9	± 1.3	± 0.4	± 1.7	± 0.7	± 0.8
M4	± 0.0	± 0.0	± 1.3	± 0.8	± 0.8	± 4.7	± 11.4	± 7.3	± 5.3	± 2.3	± 5.0	± 18.7	± 1.7	± 1.5	± 3.1	± 2.6
M5	± 0.0	± 0.5	± 0.5	± 3.3	± 2.3	± 1.4	± 10.9	± 10.6	± 0.0	± 2.3	± 3.3	± 7.6	± 1.0	± 0.9	± 1.3	± 0.9
M6	± 0.8	± 2.9	± 14.0	± 1.6	± 1.5	± 3.3	± 8.6	± 3.4	± 1.2	± 32.7	± 26.9	± 4.1	± 0.5	± 2.0	± 1.8	± 3.2
M7	± 0.0	± 0.4	± 0.8	± 0.5	± 4.3	± 17.2	± 14.5	± 13.2	± 4.7	± 19.1	± 15.9	± 7.0	± 1.6	± 0.7	± 1.9	± 0.5
M8	± 0.0	± 0.4	± 1.2	± 1.6	± 0.5	± 9.3	± 8.7	± 10.8	± 2.3	± 10.4	± 7.6	± 9.1	± 1.2	± 1.7	± 1.2	± 1.9

8.1.3 Histomorphometrie

Tab. 14: Ergebnisse und Standardabweichungen, Angaben in Prozent (s. Abschnitt 7.1.2.3)

		Ebene A		
		% neugebildeter Knochen	% Implantat	% Weichteilgewebe
zwei Wochen	M1	1.4 ± 1.84	34.8 ± 12.71	63.8 ± 11.42
	M2	5.1 ± 4.56	32.1 ± 10.62	62.8 ± 12.6
	M3	1.2 ± 0.91	33.2 ± 6.25	65.6 ± 6.25
	M4	5.4 ± 6.58	28.3 ± 11.30	66.3 ± 15.72
	M5	1.6 ± 1.99	42.8 ± 11.43	55.6 ± 11.78
	M6	1.0 ± 1.03	37.4 ± 15.27	61.6 ± 15.51
	M7	1.3 ± 0.94	61.1 ± 5.62	37.6 ± 5.21
	M8	1.3 ± 1.12	20.7 ± 6.28	78.0 ± 6.57
vier Wochen	M1	12.1 ± 8.86	7.6 ± 8.47	80.3 ± 15.43
	M2	12.7 ± 7.17	5.9 ± 6.3	81.4 ± 13.35
	M3	8.5 ± 7.1	23.1 ± 6.69	68.4 ± 9.93
	M4	18.4 ± 10.48	10.4 ± 6.97	71.2 ± 15.81
	M5	7.3 ± 6.9	28.0 ± 7.66	64.7 ± 13.44
	M6	12.4 ± 9.96	16.2 ± 5.63	71.4 ± 9.62
	M7	10.6 ± 4.17	48.7 ± 7.86	40.7 ± 8.68
	M8	11.7 ± 7.23	17.9 ± 8.4	70.4 ± 13.61
acht Wochen	M1	45.1 ± 11.62	4.0 ± 4.33	50.9 ± 14.09
	M2	35.3 ± 17.41	1.4 ± 2.82	63.3 ± 19.02
	M3	45.9 ± 17.17	6.3 ± 8.23	47.8 ± 13.59
	M4	59.5 ± 11.24	4.4 ± 3.21	36.1 ± 12.96
	M5	40.4 ± 4.77	8.9 ± 8.64	50.7 ± 11.04
	M6	41.1 ± 18.87	6.0 ± 4.26	52.9 ± 22.46
	M7	40.5 ± 11.23	22.9 ± 6.17	36.6 ± 8.96
	M8	38.3 ± 18.83	2.6 ± 4.09	59.1 ± 22.1
		Ebene B		
		% neugebildeter Knochen	% Implantat	% Weichteilgewebe
zwei Wochen	M1	4.5 ± 4.38	33.5 ± 8.6	62.0 ± 6.42
	M2	8.2 ± 6.29	31.3 ± 14.9	60.5 ± 13.86
	M3	6.9 ± 3.1	29.9 ± 8.3	63.2 ± 9.34
	M4	7.9 ± 5.31	31.4 ± 6.24	60.7 ± 4.88
	M5	4.2 ± 3.85	42.3 ± 16.94	53.5 ± 18.48
	M6	4.4 ± 2.02	34.1 ± 10.16	61.5 ± 11.33
	M7	4.1 ± 3.49	55.6 ± 5.12	40.3 ± 4.0
	M8	5.0 ± 2.57	24.6 ± 9.32	70.4 ± 8.65
vier Wochen	M1	21.8 ± 9.84	9.0 ± 6.65	69.2 ± 7.62
	M2	20.2 ± 5.61	12.9 ± 8.28	66.9 ± 10.52
	M3	20.4 ± 9.14	17.7 ± 5.35	61.9 ± 7.32
	M4	33.2 ± 7.52	14.8 ± 4.21	52.0 ± 8.5
	M5	22.1 ± 12.33	33.8 ± 5.69	44.1 ± 12.3
	M6	20.5 ± 6.06	20.3 ± 7.98	59.2 ± 5.78
	M7	14.0 ± 8.33	49.0 ± 4.5	37.0 ± 9.46
	M8	19.0 ± 9.97	15.8 ± 2.15	65.2 ± 11.45
acht Wochen	M1	44.8 ± 13.29	3.2 ± 2.73	52.0 ± 12.13
	M2	45.1 ± 16.3	2.5 ± 2.28	52.4 ± 15.09
	M3	43.3 ± 11.69	11.3 ± 4.37	45.4 ± 7.51
	M4	47.1 ± 13.74	6.8 ± 4.66	46.1 ± 13.04
	M5	34.0 ± 13.2	16.9 ± 11.34	49.1 ± 14.35
	M6	37.6 ± 10.73	14.7 ± 11.74	47.7 ± 14.1
	M7	36.5 ± 13.39	21.9 ± 14.14	41.6 ± 11.37
	M8	33.9 ± 14.16	3.4 ± 3.45	62.7 ± 13.41

**Tab. 15: Übersicht über die signifikanten Unterschiede der Resultate aus Tabelle 14;
Signifikanzen bestimmt im Post Hoc Test nach Scheffe**

Implantationszeitraum	Ebene	untersuchte Komponente	Material	ist signifikant unterschiedlich zu	P-Wert	Bewertung nach Score
Zwei Wochen	Ebene	neugebildeter Knochen			keine Sig.	
		Implantat	M7	M1	0.024	1+
				M2	0.008	2+
				M3	0.013	1+
				M4	0.002	2+
				M8	0.000	3+
		Weichteilgewebe	M7	M3	0.028	1+
				M4	0.022	1+
				M8	0.001	3+
		B	neugebildeter Knochen		keine Sig.	
Vier Wochen	A	neugebildeter Knochen			keine Sig.	
		Implantat	M7	M1	0.000	3+
				M2	0.000	3+
				M3	0.000	3+
				M4	0.000	3+
				M5	0.006	2+
				M6	0.000	3+
				M8	0.000	3+
			M5	M1	0.007	2+
				M2	0.005	2+
				M4	0.034	1+
				(M7)	0.006	2+
		Weichteilgewebe	M7	M1	0.002	2+
				M2	0.002	2+
				M4	0.035	1+
				M6	0.034	1+
				M8	0.044	1+
		B	neugebildeter Knochen		keine Sig.	
Acht Wochen	A	neugebildeter Knochen			keine Sig.	
		Implantat	M7	M1	0.001	3+
				M2	0.000	3+
				M3	0.010	2+
				M4	0.003	2+
				M5	0.035	1+
				M6	0.005	2+
				M8	0.000	3+
		Weichteilgewebe			keine Sig.	
	B	neugebildeter Knochen			keine Sig.	
		Implantat	M7	M2	0.030	1+
					keine Sig.	
		Weichteilgewebe			keine Sig.	

Score:	
p ≤ 0.001	3+
p ≤ 0.010	2+
p ≤ 0.050	1+

Tab. 16: signifikante Korrelationen der Resultate aus Tabelle 14 aus dem Korrelationstest nach Pearson

Komponente	korreliert mit	Korrelationskoeffizient	p-Wert
Neugebildeter Knochen	Implantat	-0.662	0.000
	Weichteilgewebe	-0.468	0.000
Implantat	Weichteilgewebe	-0.353	0.000

8.2 Abbildungen



Abb. 5 und 6:
Lagerung der Vorder- und der Hintergliedmaße für die Operation



Abb. 7:
Instrumentarium:
Trokar und Stößel zur Probeninsertion, spitzer und stumpfer Bohrer mit Tiefenbegrenzung und Bohrhülse (v. li.)

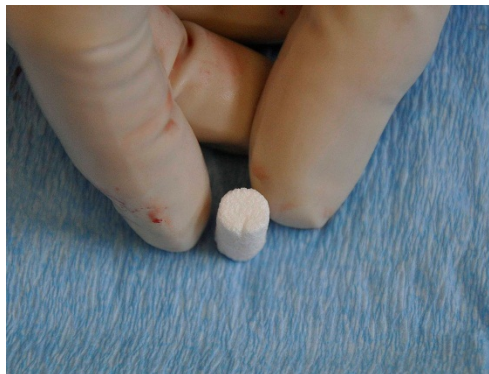


Abb. 8 (li.):
Vorbereitung der Proben für die Operation

Abb. 9 (re.):
Probenzylinder mit Kerbe

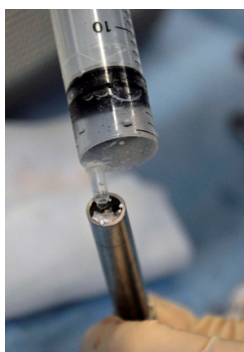


Abb. 10 und 11:
Vorbereitung der Granulate für die Implantation

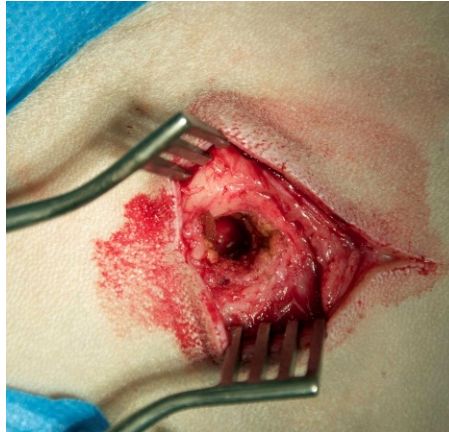


Abb. 12 und 13:
Setzen eines Bohrlochs

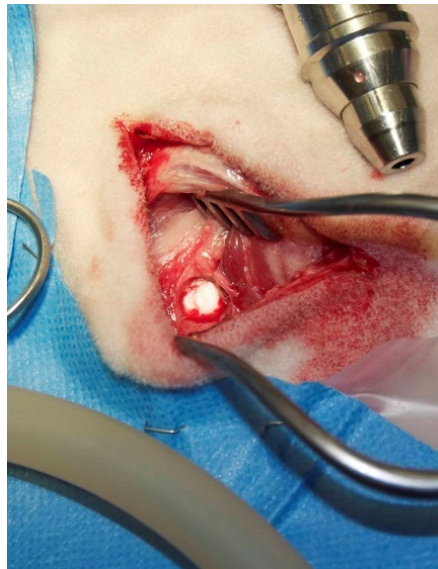


Abb. 14 und 15:
Insertion eines
Implantats in den
Bohrdefekt

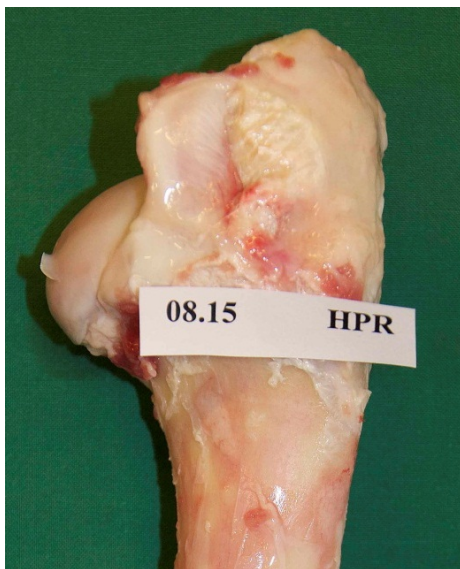
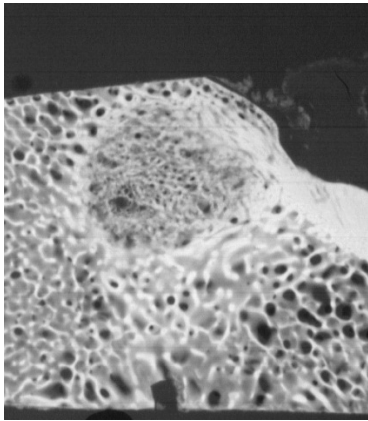
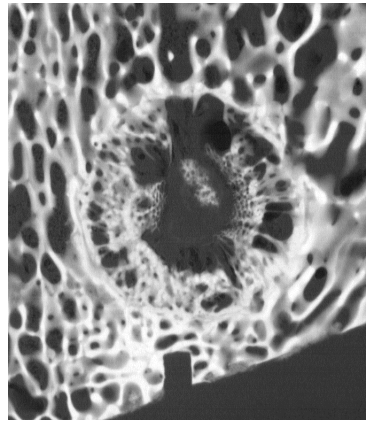


Abb. 16 (li.):
Fotografie des
Bohrlochdefekts nach
der Schlachtung

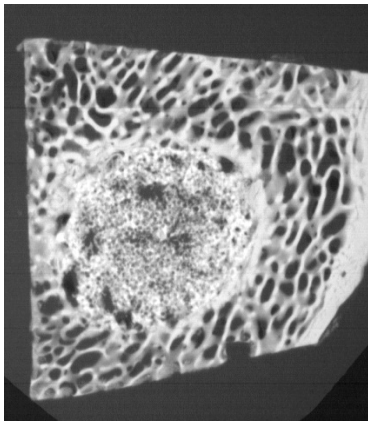
Abb. 17 (re.):
Röntgenbilder dienen
der Lokalisation der
Proben



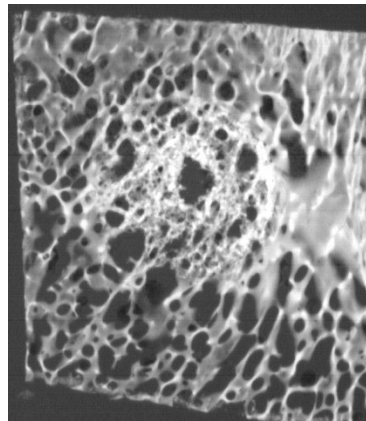
M1



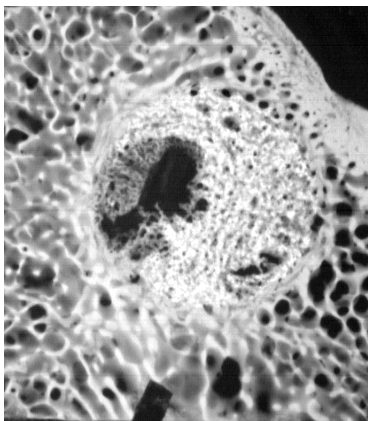
M2



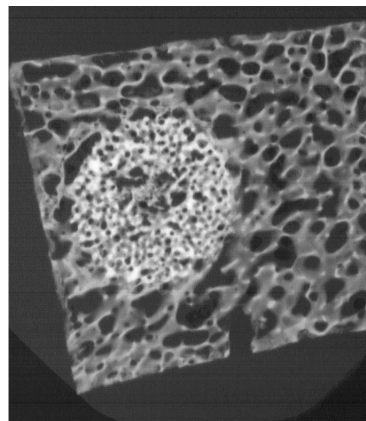
M3



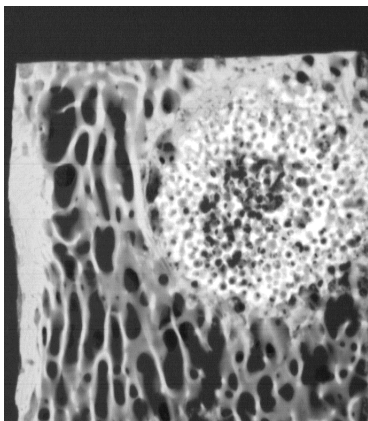
M4



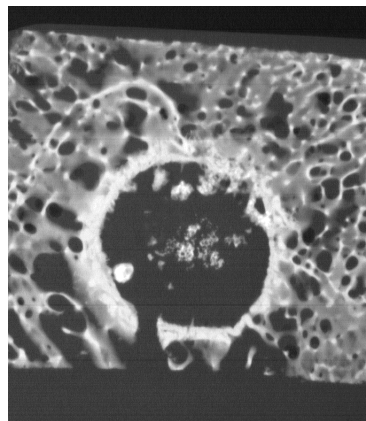
M5



M6

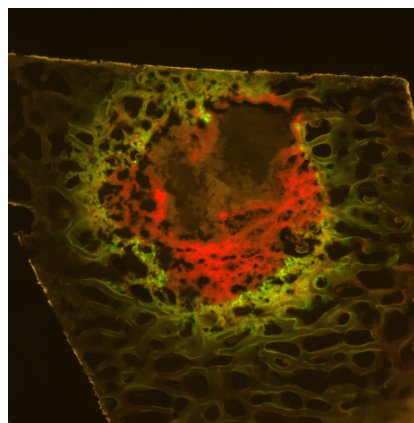


M7

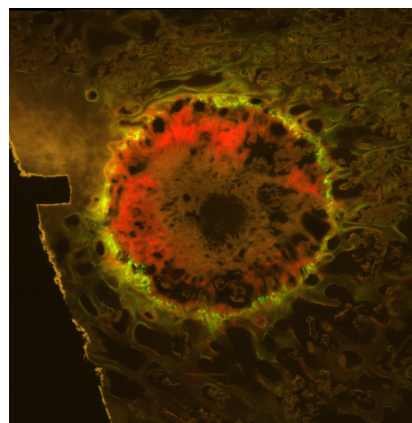


M8

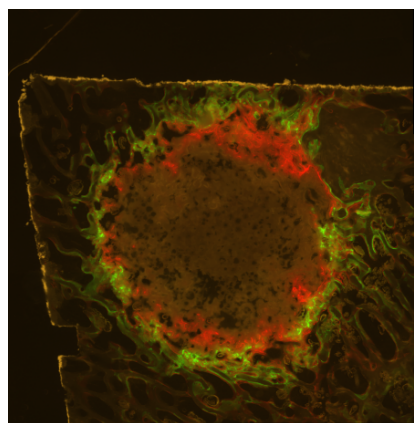
Abb. 18- 25: Mikroradiografien (Beispiele) der Biomaterialien M1-M8 nach acht Wochen



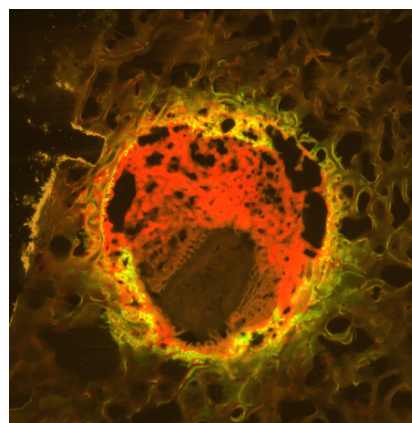
M1



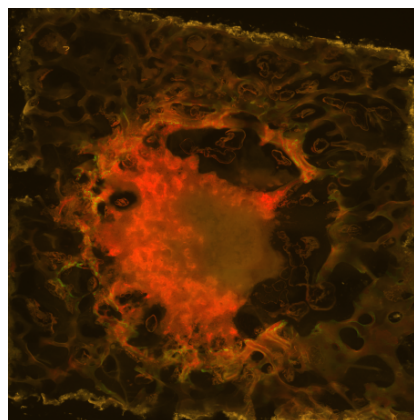
M2



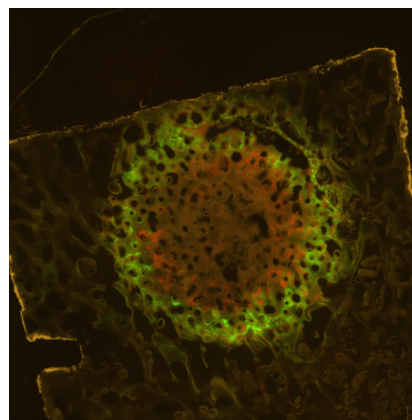
M3



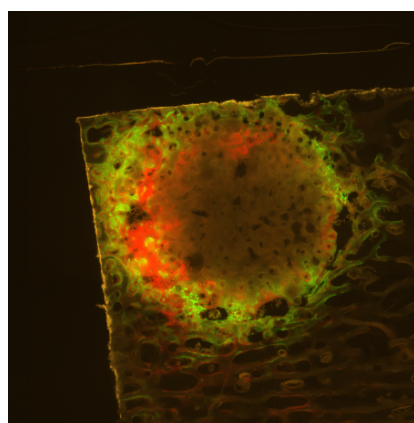
M4



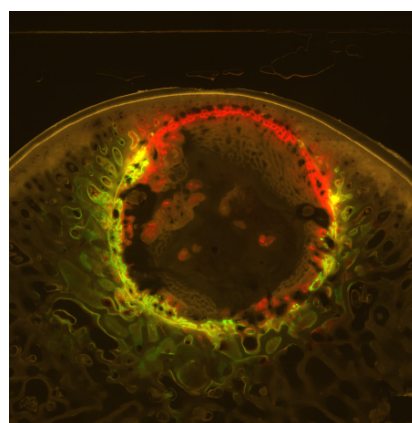
M5



M6

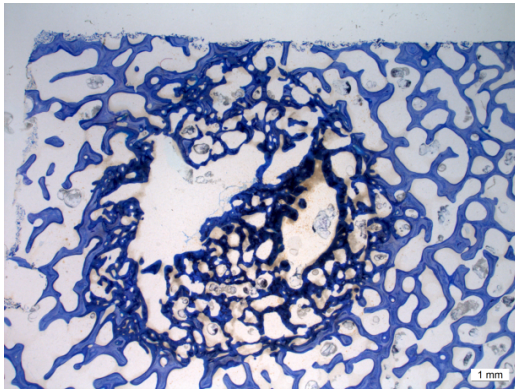


M7

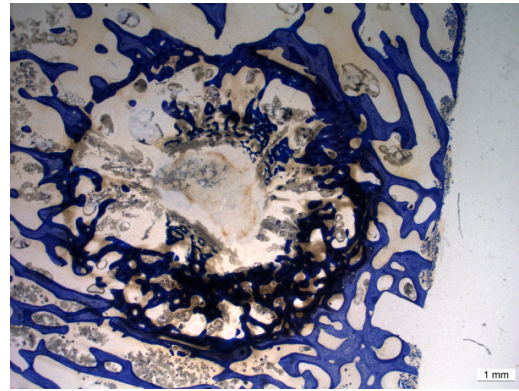


M8

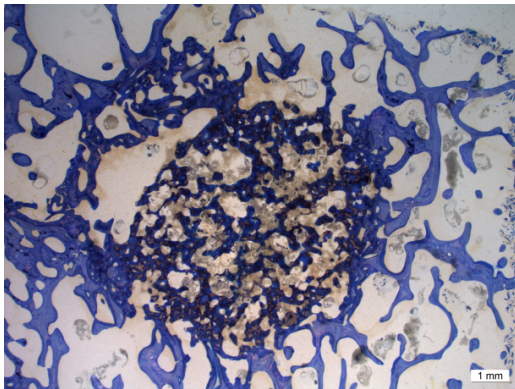
Abb. 26-33: Fluoreszenzbilder (Beispiele) der Biomaterialien M1-M8 nach acht Wochen



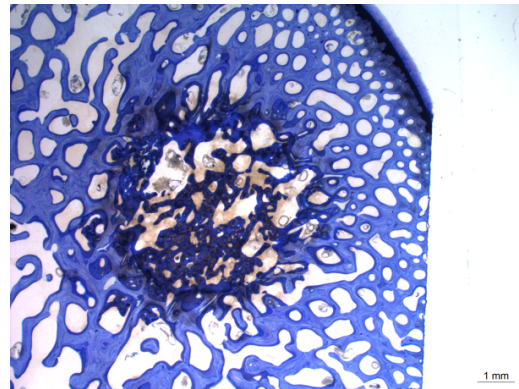
M1



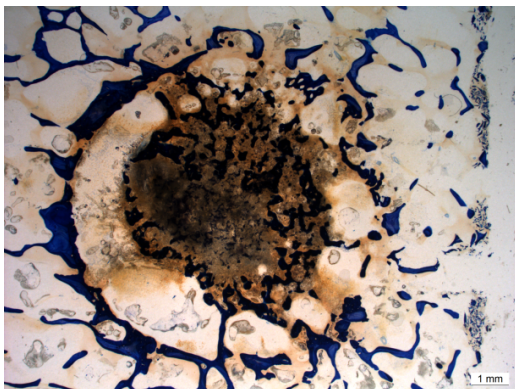
M2



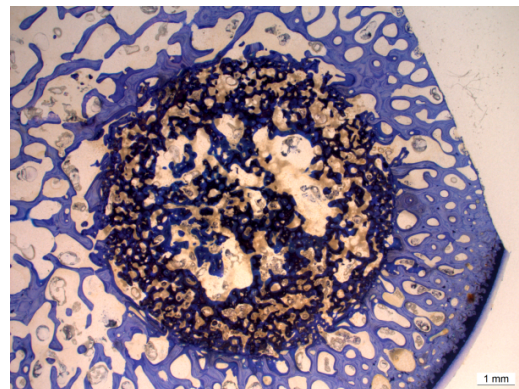
M3



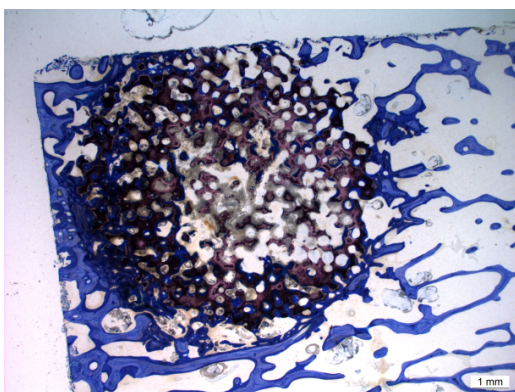
M4



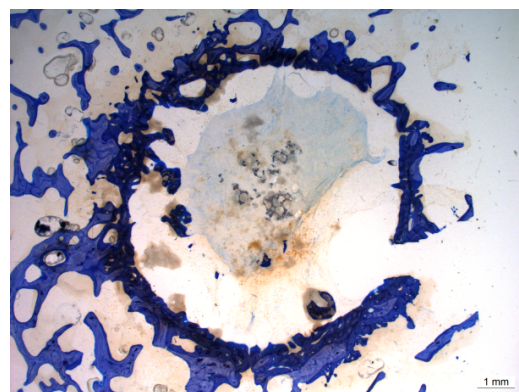
M5



M6



M7



M8

Abb. 34-41: Dickschnitte (Beispiele) der Biomaterialien M1- M8 nach acht Wochen

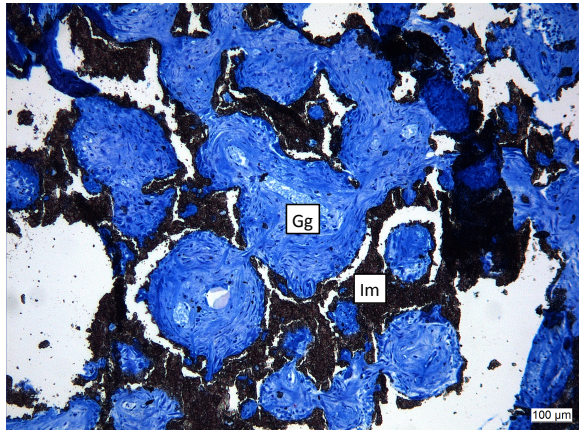


Abb. 42:
Granulationsgewebe (Gg) füllt die
Makroporen des Implantats (Im) aus;
Färbung: van Kossa/ Mc Neal

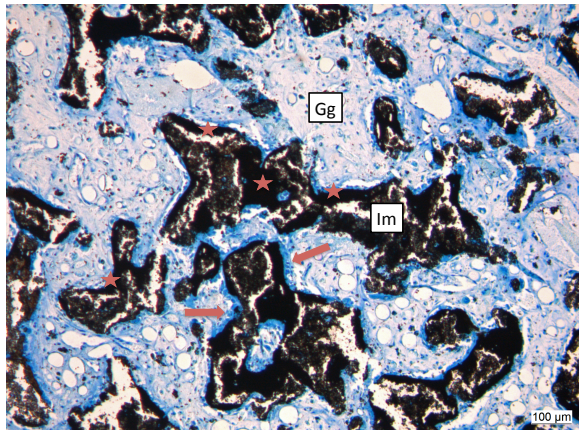


Abb. 43:
Osteoidbildung (Pfeile, beispielhaft) und
Calcifizierung des Osteoids (Sterne) an den
Grenzflächen zwischen Granulationsgewebe
(Gg) und Implantat (Im); Färbung: van
Kossa/ Mc Neal

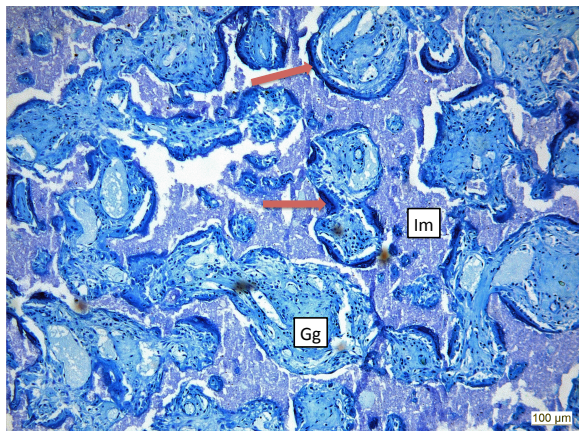


Abb. 44:
sichelförmige Anlagerung von Osteoid
(Pfeile) am Rande der mit
Granulationsgewebe (Gg) ausgefüllten
Makroporen, auf Grundlage des Implantats
(Im); Färbung: Toluidinblau

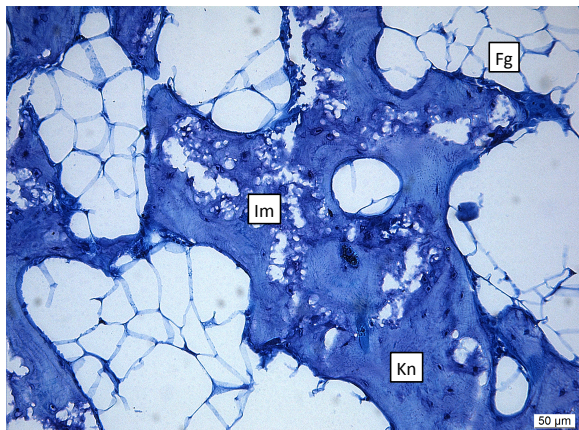


Abb. 45:
Einschlüsse von Implantatresten (Im) in
neugebildeten Knochenstrukturen (Kn); Fg:
Fettgewebe; Färbung: Toluidinblau

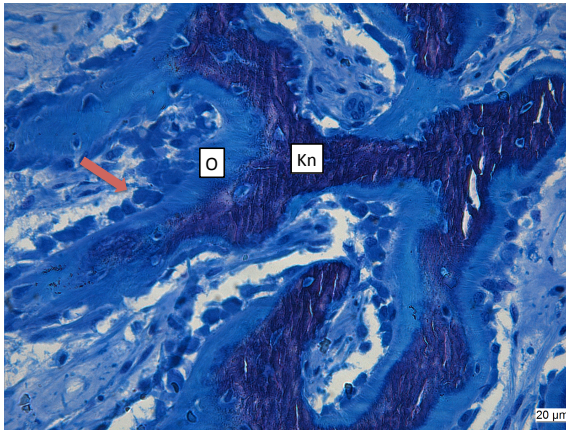


Abb. 46:
Osteoidbildung (O) durch Osteoblasten
(Pfeil); Kn: Knochen; Färbung: Toluidinblau

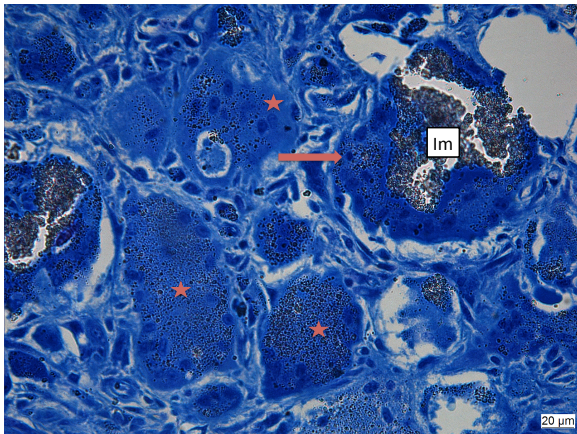


Abb. 47:
Abbau des Implantats (Im) durch
Fremdkörperriesenzelle (Pfeil),
Fremdkörperriesenzellen mit
Implantateinschlüssen (Sterne); Färbung:
van Kossa/ Mc Neal

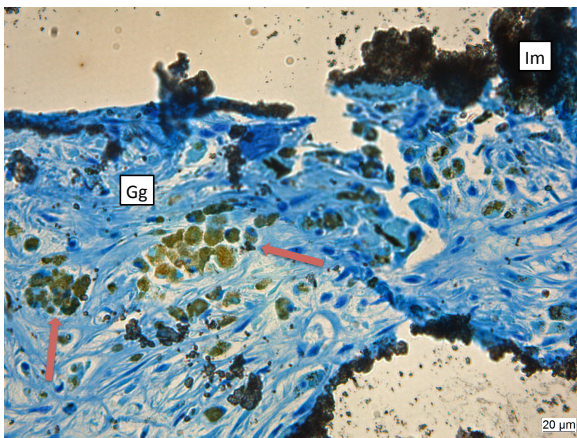


Abb. 48:
Makrophagen (rote Pfeile) liegen in dem an
das Implantat (Im) angrenzende
Granulationsgewebe (Gg), Einschlüsse von
Implantatresten sind in diesen Zellen
sichtbar; Färbung: van Kossa/ Mc Neal

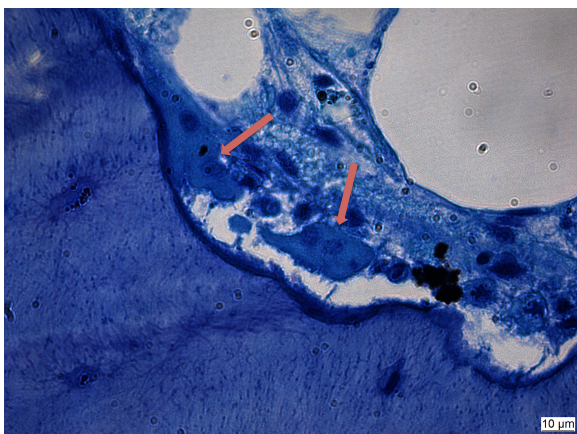


Abb. 49:
Umbau des Knochens durch Osteoklasten
(Pfeile), sichtbar ist teilweise auch deren
Resorptionszone „ruffled border“; Färbung:
Toluidinblau

8.3 Ergänzende Berichte

8.3.1 Production and characterization of the samples to be implanted

(Bericht angefertigt von Laëtitia Galea, RMS Foundation, Bischmattstraße 12, 2544 Bettlach, Schweiz)

Introduction

Project F10_0004 is an animal study aiming at studying on one hand a standard product and variations in the solubility and specific surface area on the healing of bone defects (Part 1), and on the other hand the general effect of microporosity and grain size on the in vivo resorption rate of β -TCP scaffolds (Part 2). For the first part of the study, reference material (cyclOS blocks and granules) have to be compared with higher SSA β -TCP blocks (turbOS blocks) and higher SSA and solubility blocks (DCP blocks). The production of the samples of the first part of the study did not pose problems. The reference samples of the first part were prepared according to the operating procedure of MAB. The turbOS blocks were prepared according to RMS project F10_0003. The DCP blocks were produced according to RMS projects A07_0169³⁶ and F09_0043. The preparation of the samples of the second part of the study required more investment, since no similar samples were already produced previously in the RMS. This preparation required thus some preliminary experiment to determine the influence of different preparation parameters on the final properties of scaffolds. A pre-study was thus performed and separated in 4 parts. The first part concerned the influence of a plateau and of different plateau temperatures on the densification. The second and the third parts concerned the influence of the sintering temperature and of the preparation method on microporosity and grain growth. The fourth part evaluated the influence of additives on the microporosity, and the influence of the initial powder particle size on the final grain size after sintering. Different sample preparation methods were thus evaluated during the pre-study to obtain samples with different grain sizes and microporosities independently of each other, allowing us to design the preparation of the samples for the 2nd part of the animal study, i.e sample with low or high microporosity, and small or large grain size. All results of the 4 pre-study parts were reported in previous reports.

Materials and Methods

TCP powder: α -TCP was produced according to the in-house protocol (SOP 729053 until point 5). The powder was then processed in 2 parts in 2 different ways:

- (i) milled in a planetary mill for 2h with 10% fumaric acid and 2ml ethanol in 100g portions. It was then calcined for 12h at 500°C. This powder was called “standard”;
- (ii) ball milled for 6h in ethanol, dried in air and then calcined 1h at 500°C and 1h at 700°C. This powder was called “bad-700”.

Additives: PEG from MAB’s production was sieved and only the fraction between 250 and 600um was used. The PEG amount used corresponded to the amount that is used with standard MAB’s raw material to obtain 70% porosity after sintering. Stearic acid also from MAB’s production was used. White flour was bought in Coop. It was mixed to the α -TCP powder proportionally to the PEG amount, i.e. the weight of flour corresponded to 50% of the PEG weight. The PEG aimed at producing macroporosity, while the flour aimed at producing microporosity. The stearic acid is a lubricant.

Reference cyclOS blocks (group 5): The samples were prepared with the “standard” powder, mixed with PEG and stearic acid to obtain 70% macroporous samples. PU cylindrical matrices were filled with this powder mix and isostatically pressed. After pressing the cylinders were cut in prism, about 12-13 mm of section and 40-50 mm high. A part of the prisms was then sintered according to the sintering curve “cyclOS” in Figure 1 (maximum temperature of 1100°C). After sintering, 12 of the prisms were turned into 8.0mm diameter cylinders with a height of 13.0mm.

Reference cyclOS granules (group 8): A part of the sintered prisms prepared for the cyclOS blocks was granulated in a jaw crusher in order to obtain 1.4-2.8mm granules.

turbOS blocks (group 6): A part of the pressed prisms prepared for the cyclOS blocks was sintered according to the sintering curve “turbOS” in Figure (maximum temperature of 900°C). After sintering, the prisms were turned into 8.0mm diameter cylinders with a height of 13.0mm.

DCP blocks (group 7): β -TCP blocks were produced with the standard α -TCP powder according to the in-house protocol (SOP 724013), but without paraffin and all related steps. After sintering at 1200°C, the blocks were cut into smaller cylinders of 8.25mm diameter and 13.75mm height. The cylinders were then sintered at 1500°C for 12h

(+5°C/min), followed by air quenching. After sintering, the samples were incubated in 0.7M phosphoric acid at 80°C for 48h in a solid-to-liquid ratio of 0.2ml/g. The samples were then rinsed with deionized water and ethanol and dried for at least 2 days at 60°C.

Low microporosity, small grain size samples (group 3): The samples were prepared with the “standard” powder, mixed with PEG and stearic acid to obtain 70% macroporous samples. PU cylindrical matrices were filled with this powder mix and isostatically pressed. After pressing the cylinders were cut in prism, about 12-13 mm of section and 40-50 mm high. The prisms were then sintered at 1000°C for 1h, according to the sintering curve B in Figure 1 (maximum temperature of 1000°C). After sintering, the prisms were turned into 8.0mm diameter cylinders with a height of 13.0mm.

Low microporosity, big grain size samples (group 4): 1 PU cylindrical matrix was filled with the “bad-700” powder, PEG and stearic acid and isostatically pressed. The pressed cylinders were cut into prisms before being turned into 8.31-diameter and 13.45mm-height cylinders. These cylinders were sintered according to sintering curve A in Figure 2 (maximum temperature of 1300°C).

High microporosity, small grain size samples (group 1): 1 PU cylindrical matrix was filled with the “standard” powder, PEG, stearic acid and flour and isostatically pressed. The pressed cylinders were cut into prisms before being turned into 8.35-diameter and 13.50mm-height cylinders. These cylinders were sintered according to sintering curve B in Figure 2 (maximum temperature of 1000°C).

High microporosity, big grain size samples (group 2): 1 PU cylindrical matrix was filled with the “bad-700” powder, PEG, stearic acid and flour and isostatically pressed. The pressed cylinders were cut into prisms before being turned into 8.60-diameter and 13.65mm-height cylinders. These cylinders were sintered according to sintering curve A in Figure 2 (maximum temperature of 1300°C).

Characterization: After sintering, some samples of each group were measured with a caliper gauge and weighed to calculate the apparent density. The apparent density was always reported to the theoretical density (3.07g/cc for β -TCP) to calculate a relative density. One sample per group was used for grain size determination. For this purpose, the samples were broken and calcined at 900°C for 1h and the broken surfaces were observed with SEM. One sample per group was used for SSA measurements (BET method) and another one for XRD measurements. Finally, micro-computed tomography

measurements were performed on 18 samples of each group, but those results will be presented apart in a following report.

Sterilization:

After the μ -CT measurements, all samples except those of groups 4, 6 and 7 were calcined by 900°C for 1h. Group 4 was calcined at 900°C for 12h, due to a remaining α -TCP fraction in the samples. Group 6 was calcined at 800°C for 1h, instead of 900°C, since those samples were only sintered at 900°C during the preparation. Group 7 was not calcined, since monetite is a low temperature phase that would decompose at high temperatures. Finally, all samples were sterilized by γ -irradiation with a 25kGy dose.

Results and discussion

Porosity:

The porosity of the cyclOS samples was higher than 70%, what was originally planned. This might be due to the sintering at a lower temperature than usually (1100°C instead of 1150°C), but also to the use of a different powder. The porosity of the cyclOS granules could not be measured due to the irregular shape, but the one of the cyclOS blocks was taken since the preparation until shaping step was the same. The turbOS samples were sintered at a lower temperature (900°C), increasing the porosity compared to the cyclOS samples. The DCP samples had the lowest porosity, due to growth of crystals in the structure during incubation (Figure 3, above). The porosity of the samples of the second part were all significantly different, but the porosity values of the samples without flour were very close (78.3 ± 0.4 % and 78.8 ± 0.5 %) and much smaller than the porosity values of the samples with flour. Those samples had a porosity difference of about 2.5%. (83.8 ± 0.5 % and 81.2 ± 0.7 %), which was bigger than (Figure 3, below).

Specific surface area:

The specific surface area of the cyclOS samples was about $0.5 \text{ m}^2/\text{g}$ (Figure 4, above) thus slightly higher than standard cyclOS samples, maybe due to the sintering at lower temperature. As expected, the turbOS samples, sintered at much lower temperature, showed a higher SSA (about $2 \text{ m}^2/\text{g}$) than the cyclOS samples. This value was nevertheless smaller than for the original turbOS samples produced in project F10_0003, maybe due to a longer holding time at maximum temperature. The monetite samples showed a much higher specific surface area (about $6 \text{ m}^2/\text{g}$), than cyclOS

samples, according to previous experiments (F09_0018, F09_0043). The specific surface area was larger for the samples made with the fine powder than with the coarse powder (Figure 4, below) probably due to the grain size difference. Surprisingly, the SSA was larger when no flour was used, i.e. for the less microporous samples.

Grain size:

The cyclOS samples had apparent grain size of $1.2 \pm 0.4 \text{ }\mu\text{m}$ (Figure 5, above). The turbOS samples that were sintered at lower temperature had an apparent grain size of $0.29 \pm 0.05 \text{ }\mu\text{m}$. The crystals that have grown on the surface of the pores in the DCP samples were about $9 \pm 2 \text{ }\mu\text{m}$. The samples produced with the fine powder, sintered at 1000°C , with and without flour presented an apparent grain size of 0.7 ± 0.3 and $0.8 \pm 0.2 \text{ }\mu\text{m}$, respectively (Figure 5, below). The use of the coarse powder and sintering at 1300°C led to grain sizes of 5 ± 2 and $5 \pm 1 \text{ }\mu\text{m}$ with and without flour, respectively.

Crystalline phase composition:

The cyclOS and turbOS blocks had less than 1% remaining α -TCP (Figure 6, above). The cyclOS granules showed slightly more α -TCP (1%), which is surprising since the granules came from the same sintered prisms than the blocks. The DCP samples were composed of 99% DCP, slightly less than 1% remaining α -TCP and traces of DCPD and β -TCP. The samples produced with flour with both powders and the samples produced without flour with the fine powder were made of more than 99% β -TCP, the rest being α -TCP (Figure 6, below). Primarily, the samples made with the coarse powder without flour only converted back to about 35% β -TCP, the rest being remaining α -TCP. No explanation was found, but more α -TCP phase could be converted into β -TCP with 12 hours calcination at 900°C . The final composition of these samples, i.e. the composition of the samples implanted, was 84% β -TCP and 16% remaining α -TCP.

Conclusions

As expected, the turbOS samples had a higher SSA than the cyclOS samples, which is due to the smaller grain size obtained with a lower sintering temperature. In addition, the lower sintering temperature led to a higher microporosity. The DCP samples had a much higher SSA than all other samples, combined with a more soluble crystalline phase (monetite) but a lower microporosity due to crystal growth during the phase transformation. The differences in grain size between the small-grain-size samples and

the big-grain-size samples was about a factor 10, as expected, and the grain sizes were similar between samples with high and low porosity. The low-microporosity samples had a porosity of about 78% for both small-grain-size and big-grain-size samples. The high-microporosity samples had a higher porosity than the low-microporosity samples, but there was a significant difference between the small- and big-grain-size samples. Nevertheless, comparisons parameter-by-parameter should be possible, instead of a complete parameter study.

Tables and figures

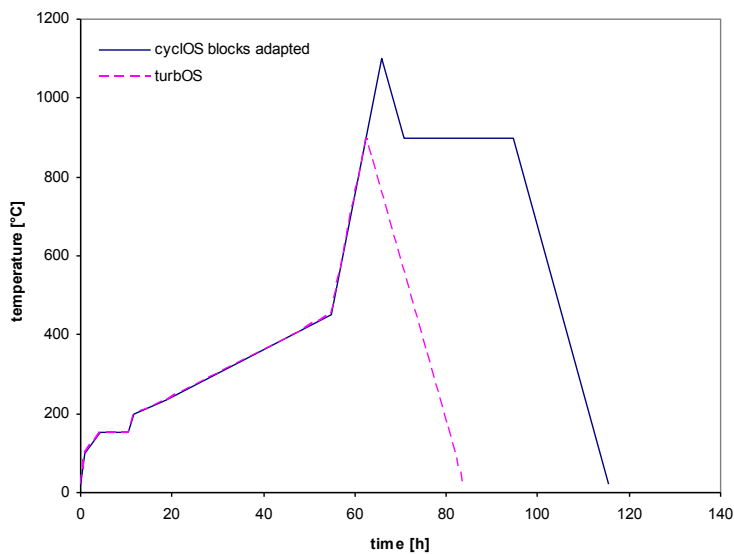


Figure 1: Sintering curves for the cyclOS and turbOS blocks and granules.

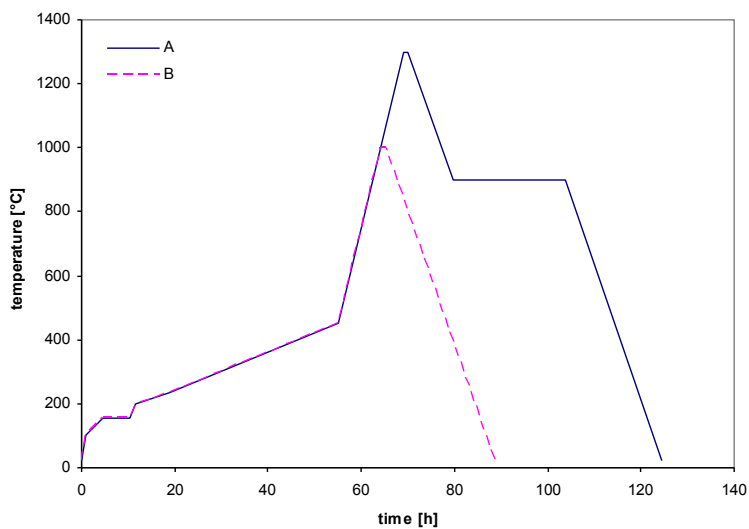


Figure 2: Sintering curves for the low and high microporosity samples with small (curve B) or large (curve A) grain size. After sintering at temperatures higher than 1100°C a plateau at 900°C is necessary to convert back the α -TCP phase into β -TCP.

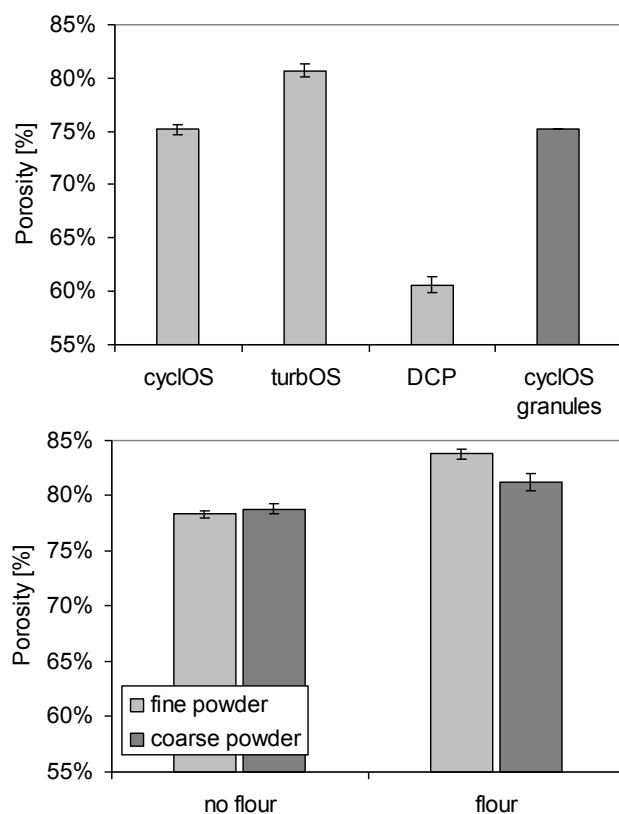


Figure 3:
Porosity measured by gravimetry. Above: samples for the first part of the study; below: samples for the second part of the study.

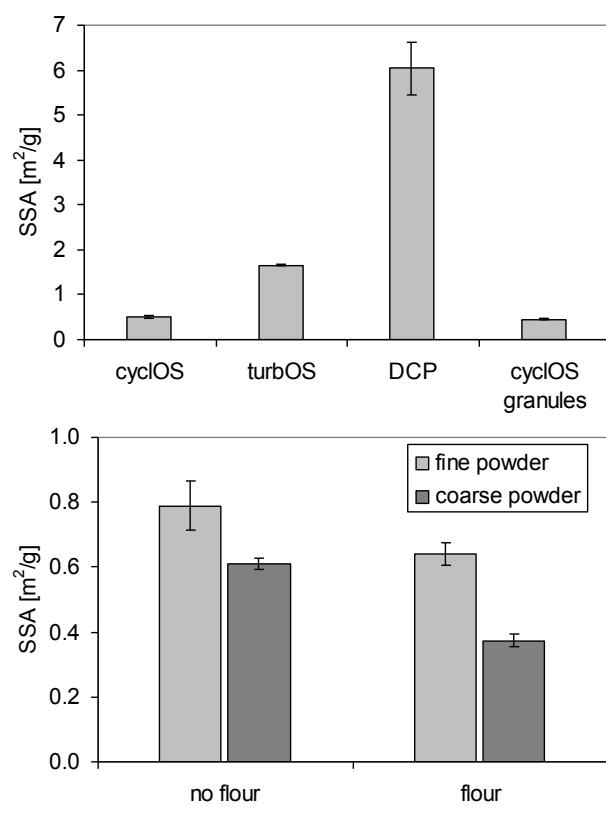


Figure 4:
Specific surface area measured by N₂ adsorption and the BET model. Above: samples for the first part of the study; below: samples for the second part of the study.

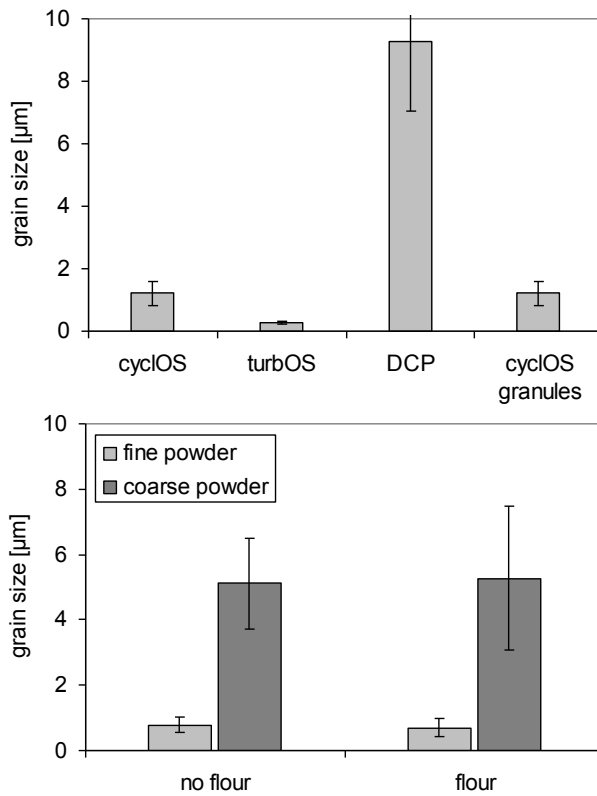


Figure 5:

Grain size evaluated on SEM pictures.

Above: samples for the first part of the study; below: samples for the second part of the study.

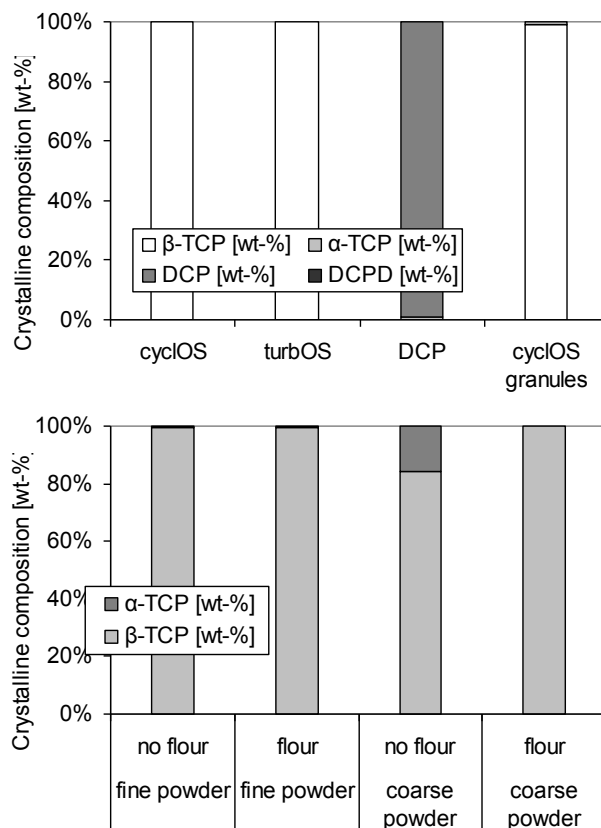


Figure 6:

Crystalline composition measured by XRD.

Above: samples for the first part of the study; below: samples for the second part of the study.

8.3.2 Phase Composition of DCPA Explantates

(Bericht angefertigt durch Nicola Döbelin, RMS Foundation, Bischmattstraße 12, 2544 Bettlach, Schweiz)

Sample Preparation

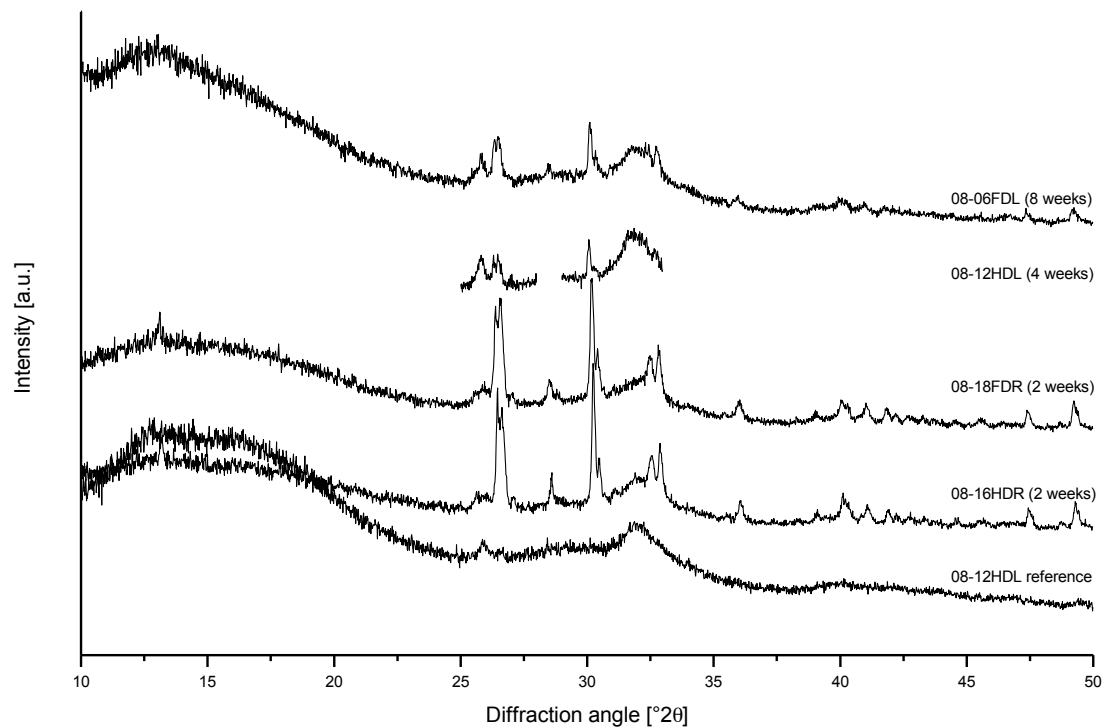
Embedded samples of DCPA (monetite) preforms explanted after 2, 4, and 8 weeks were analyzed non-destructively for their crystalline phase composition. XRD patterns were collected on surfaces of cross sections. In case of thin slices (08-12HDL, 08-16HDR, 08-18FDR) a spinning sample holder was used, for larger samples (08-12HDL, 08-06FDL) a non-spinning bracket sample holder was used. One sample with only polymer and bone, but no implant surface, was analyzed as a reference.

Device Settings

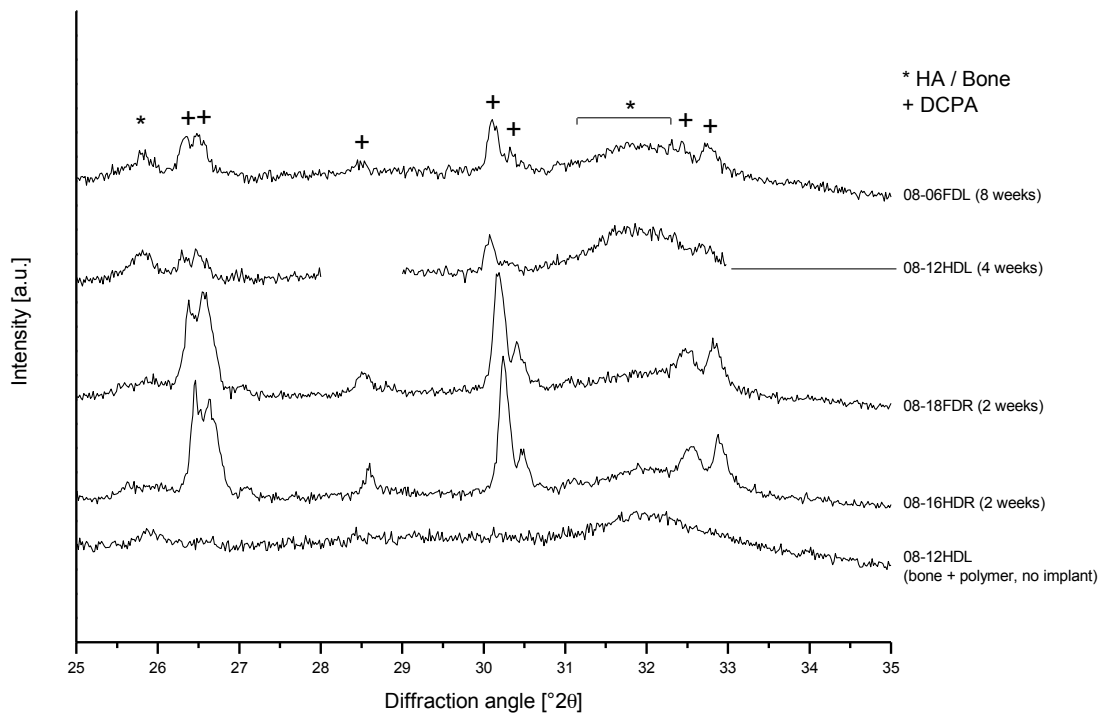
Diffractometer:	Panalytical X'Pert Pro, θ/θ Bragg-Brentano geometry
Radiation:	$\text{CuK}\alpha$, Ni filtered
Generator:	40 kV, 40 mA
Apertures:	Automatic divergence slit 10 mm Soller slits 0.02 rad Incident beam mask 10 mm Anti-scatter slit 10 mm
2θ range:	10–50°
Counting time:	40 seconds per step
Spinning:	1 revolution per second, when used

Results

All diffraction patterns and a detailed section is shown in Figure 1. Quantification of the results was not possible, because the phase fractions were biased by the amount of bone, polymer, and implant in the observed area. A qualitative analysis showed that all samples contained substantial amounts of DCPA (monetite). The 4- and 8-week samples showed a slightly sharper 002 reflection of HA ($25.8^\circ 2\theta$), suggesting slightly higher crystallinity or larger crystallite size. However, the data was not sufficient for a more detailed analysis. Due to time constraints, only relevant ranges were measured for sample 08-12HDL. In general, the data did not allow to distinguish bone mineral from HA formed by hydrolysis of DCPA.



G:\Auftr_Proj\F-Auftraege_Projektel\2010\F10_0004\XRD\Explantate-111007\plots\plots-explantate.opj



G:\Auftr_Proj\F-Auftraege_Projektel\2010\F10_0004\XRD\Explantate-111007\plots\plots-explantate.opj

Figure 1: A detailed view of the range $25\text{--}35^\circ$ 2θ shows that in all samples reflections of DCPA (monetite) were evident. There were signs of slightly sharper 002 HA reflections in the 4-, and even more so the 8-week samples, which would be caused by larger crystallite sizes. But the signal was too weak for a more detailed analysis.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
β -TCP	β -Tricalciumphosphat
BID	bis in die; zwei Mal täglich
bzw.	beziehungsweise
DCP	Dicalciumphosphat
HA	Hydroxylapatit
i.m.	intramusculär
i.v.	intravenös
KGW	Körpergewicht
PMMA	Polymethylmethacrylat
s.c.	subcutan
SID	semel in die; ein Mal täglich
Tab.	Tabelle
Vol.-%	Volumenprozent
μ -CT	Mikro-Computertomografie

Danksagung

Brigitte von Rechenberg danke ich ganz herzlich für die vertrauensvolle Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche und menschliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit. Auch **Marc Bohner** und **Laëtitia Galea** von der RMS Foundation danke ich ganz besonders für die stets sehr gute und intensive Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön für die Betreuung meiner Arbeit und die Unterstützung bei der Lösung der alltäglichen Probleme bei der Arbeit an der MSRU gilt **Katja Nuss**, **Michèle Sidler**, **Karina Klein** und **Agnieszka Karol**. **Käthi Kämpf** danke ich für die unermüdliche und geduldige Unterstützung bei der Laborarbeit und die stets beruhigenden Worte. **Silke Wüst** danke ich für die Anfertigung der μ -CTs und die Probenanalyse.

Ein großes Dankeschön für die unvergessliche und lustige Zeit in Stall und Büro gilt meinen Kollegen an der MSRU: **Philipp Conze**, **Nathalie Fouché**, **Ingmar Meth**, **Tetyda Dobak**, **Isabel Mosch**, **Francis Pusch**, **Henning Richter**, **Anke Schulze-Grotthoff**, **Oliver Gehrig**, **Ansgar Solecki**, **Flurina Clement-Frey**, **Svende Pfundstein**, **Lea Gegner**, **Lena Müller** und **Julia Freudenhammer**.

Dankeschön vielmals an die Tierpfleger der MSRU und des Tierspitals, die sich stets liebevoll um meine Schafe kümmerten.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern **Dorit** und **Elmar Lapczyna**, meiner Familie in Magdeburg, Knau, Kerchau und Warnemünde und meinen Freunden, mit deren Liebe, Hilfe und Unterstützung ich stets rechnen konnte, obwohl sie während meiner Zeit an der MSRU so manches Mal auf mich verzichten mussten.

Christian Sternkopf gilt ein Dankeschön „mit Abstand“ für ein wunderschönes, abenteuerreiches Jahr, trotz tausender zurückgelegter Kilometer.

Curriculum Vitae

NAME Henriette Lapczynya

GEBURTSTAG 30. Mai 1984

GEBURTSORT Magdeburg

NATIONALITÄT Deutsch

SCHULBILDUNG

1994- 2003 Gymnasium „Otto von Guericke“, Magdeburg

2003 Abitur

STUDIUM

2003 Anglistik und Hispanistik, Universität Leipzig

2004-2010 Veterinärmedizin, Universität Leipzig

BERUF

2010 Approbation

2010 chirurgisches Internship, „Tierklinik Dr. Reif“, Böbingen

2010-2011 Doktorandenstelle an der Musculoskeletal Research Unit des
Departements für Pferde der Vetsuisse Fakultät, Zürich (Schweiz)
Dissertationsthema: „*Untersuchungen zu Biokompatibilität,
Resorptionsverhalten und Knochenheilung nach Implantation
poröser Knochenersatzmaterialien auf Basis von β -
Tricalziumphosphat und DCP*“